



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

Departamento de Química Agrícola

TESIS DOCTORAL

**PLANT-BASED METHODS FOR REMEDIATING ARSENIC-POLLUTED MINE
SOILS IN SPAIN.**

**RECUPERACIÓN DE SUELOS MINEROS CONTAMINADOS CON ARSÉNICO
MEDIANTE FITOTECNOLOGÍAS.**

EDUARDO MORENO JIMÉNEZ

Madrid, 2010

Directores: Dr. Jesús M. Peñalosa Olivares y Dra. Elvira Esteban Fernández



Facultad de Ciencias

Departamento de Química Agrícola

JESÚS MANUEL PEÑALOSA OLIVARES, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, Y ELVIRA ESTEBAN FERNÁNDEZ, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

CERTIFICAN:

Que D Eduardo Moreno Jiménez, ha realizado bajo nuestra dirección y en este Departamento el trabajo que lleva por título "PLANT-BASED METHODS FOR REMEDIATING ARSENIC-POLLUTED MINE SOILS IN SPAIN" que constituye su Memoria de Tesis Doctoral. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Madrid, a 4 de Marzo del 2010.

Fdo: Jesús M. Peñalosa Olivares

Fdo: Elvira Esteban Fernández



Facultad de Ciencias

Departamento de Química Agrícola

AGUSTÍN GARATE ORMAECHEA, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA, DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: "PLANT-BASED METHODS FOR REMEDIATING ARSENIC-POLLUTED MINE SOILS IN SPAIN" se ha realizado en este Departamento bajo la dirección del Dr. Jesús M. Peñalosa Olivares y la Dra. Elvira Esteban Fernández, y que constituye la Memoria que presenta D Eduardo Moreno Jiménez para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Madrid, a 13 de Noviembre del 2009.

Fdo: Agustín Gárate Ormaechea

Abstract

Arsenic is a trace element which is naturally found in the environment, but human activities have increased its concentration in soils. Pyritic mining is a major source of As in the soil, but there are others, such as agriculture or coal burning. Arsenic speciation in soils is complex, with organic forms including methylated As (MMA, DMA), or As bound to sugars, whilst inorganic species include arsenite and arsenate, which are the most abundant. If flooded soils are excluded, the majority of As in aerated soils is H_2AsO_4^- (acid soils) or HAsO_4^{2-} (neutral and basic). The availability of As in soils is usually driven by many factors, such as pH, Fe-oxides, phosphorus, (co)precipitation in salts, organic matter, clays, rainfall, etc. The available fraction (which is the most mobile as well) can be potentially uptaken by plant roots, although its concentration is usually low. As far as we know, arsenic has no biological function in plants, so that it is considered to be a toxic element. Once inside root cells, As(V) is quickly reduced to As(III), and complexed in many plant species. Plants cope with As using detoxification mechanisms (complexation, compartmentalization, cell wall retention...), but phytotoxicity symptoms appear once those mechanisms are saturated. Phytotoxic effects include growth inhibition, chlorophyll and nutrient degradation or oxidative stress. Phosphorus nutrition will influence As(V) uptake and toxicity in plants. Recently, the soil-plant system has been intensively studied, after reporting phytoremediation as an emerging, promising technology for soil reclamation. Within this technology phytoextraction consists of the uptake of As and translocation to the harvestable parts of plants, after which they are removed; whilst phytostabilization and phytoimmobilisation are plant-aided stabilization techniques to reduce As mobility. In many cases, the use of native plants would be an advantage from the technical and ecological point of view. We selected two arsenopyritic mine soils as working scenarios, one of them affected by a mine spillage in Aznalcóllar (Seville, Spain), and the other in Bustarviejo (Madrid, Spain), a derelict mine.

The main objective of this Thesis is to study how Mediterranean native plants cope with arsenic, the transfer of this element from the mine soils to plants and the usefulness of some of plant species for phytoremediation of As-polluted mine soils.

Dealing with this objective, the experimental part covered several scales of working: (i) hydroponics under controlled conditions to evaluate the As resistance and As accumulation in Mediterranean shrubs, (ii) short-term pot trials with soil to study As phytoavailable fraction, (iii) long-term pot experiments with soils to study As dynamics in the soil-plant system, the transfer of As to plants and the effects of plant culture on soil quality, (iv) field trials to evaluate As fate under real conditions, the factors affecting its mobility, the transfer to plants, and the efficiency of re-vegetation procedures.

The conclusions derived from these experimental procedures are:

1) A valid methodology was developed to analyze As in the soil-plant system. Total element determination in both plants and soils after autoclave digestion with nitric acid and hydrogen peroxide showed good recoveries and a high reproducibility. Ammonium sulphate (0.1 M) was a good extractant for assessing As phytoavailability in our soils, both under laboratory and field conditions.

2) The selection of a phytotechnology for a particular As contaminated soil requires studies at different scales, from hydroponics to field conditions. Working in this way, we obtained complementary information:

i) After a hydroponic experiment with different As doses to 6 plant species, *Retama sphaerocarpa* and *Tamarix gallica* were the most resistant species, and *T. gallica* accumulated the largest amount of As.

ii) Four plant species selected in the previous hydroponic experiment were tested in a pot trial under semi-controlled conditions with a moderately As-contaminated soil, additionally polluted by pyritic sludge application in some treatments. Plant establishment induced a positive effect on soil quality, improving C, N and enzymatic activity in soils. The best effects were obtained for *R. sphaerocarpa* and *Myrtus communis*. Despite gave the promising results of *T. gallica* in hydroponics, this plant did not perform well in the pot trial.

iii) In a field trial in the Green Corridor of the Guadiamar river (Aznalcóllar, Spain) using the same plant species as in pot trials, *R. sphaerocarpa* showed the highest survival rate, *Rosmarinus officinalis* survived efficiently in soils at pH>4, and *T. gallica* and *M. communis* showed a low survival rate. Soil to plant transfer of As was low.

The multi-scale approaches allowed us to select *Retama sphaerocarpa* plants as the best candidate for As phytostabilisation of mine soils between the plant species used for the revegetation of the Green Corridor of the Guadiamar river.

3) Twenty five plant species (ferns, herbs, and woody plants) and waters (surface waters and interstitial pore water) were collected in a field survey around a derelict As-mine in Bustarviejo (Madrid, Spain). All the plants showed low concentrations of As in shoots despite the high levels of As in some soils at this site. *Salix atrocinerea* and *Cytisus scoparius* plants showed high bioaccumulation factors ($[As]_{shoot}/[As]_{available}$) and had some interesting characteristics. For instance, *S. atrocinerea* was abundant in the riparian communities and has a quick growth rate, whilst *C. scoparius* is a leguminous species with a high presence in the drier soils. These properties make both species interesting candidates for phytoremediation, and further studies will be carried out to assess their potential.

4) Arsenic was abundantly retained in the roots of Mediterranean plants, blocking translocation to shoots. This hinders toxic values of As in shoots, even under hydroponics. Consequently, most of the studied plants had low As concentration in aboveground tissues. Arsenic supply in the hydroponic experiment promoted toxicity symptoms in plants: growth inhibition, oxidative stress, chlorophyll depletion, and induction of detoxification mechanisms (thiol synthesis).

5) The fraction of mobile/available As was always small in well aerated Mediterranean soils affected by arsenopyritic mining, appearing arsenic bound in insoluble fractions. Only <0.3% and <0.7% of the total As was extractable by ammonium sulphate in soils from Aznalcóllar and Bustarviejo, respectively. Arsenic bound to oxides ranged from 40-90% of the As in the soil, As being adsorbed onto oxides proving to be the major process controlling As immobilization. In soils with high As levels, the metalloid was also bound to sulphides. Both oxides and sulphides are the most immobile fractions. For this reason phytoextraction is not appropriate in these soils, remaining phytostabilisation as the most realistic alternative among the phytotechnologies.

6) After a soil and root incubation experiment, the risk of As mobilization due to root decomposition was found to be low, confirming the prospects for long-term phytomanagement and phytostabilisation of arsenic.

7) Dynamics of phosphate in the soil-plant system was intimately related with arsenate. Arsenic mobilization was observed in the presence of phosphate, both in Bustarviejo and in the root incubation experiment. The depletion in P concentration in plants when high As doses were applied in the nutrient solution of Mediterranean shrubs can be attributed to the competition between arsenate and phosphate at the uptake level.

8) Prospects for applying some of the studied plant species in phytostabilisation are promising, for instance *Retama sphaerocarpa*, *Rosmarinus officinalis*, *Salix atrocinerea* or/and *Cytisus scoparius*. Even where As levels in soils are high (100-1000 ppm), aboveground plant organs showed a low As concentration, and plants resisted the high contamination levels. Therefore, phytostabilisation is the most realistic option. The long-term sustainability of the ecosystem could involve multi-species communities. In many of these soils, metals were also detected (i.e., Cd and Zn), being more mobile than As. Their mobility should be taken into account as well. The long term success of phytostabilisation requires a continuous monitoring of trace elements in soils and plants.

The low availability of As, the identification of As-resistant species with an excluder behavior, the improvements derived from plant culture in As-polluted soils and the low risk of re-distribution of As from roots to available fractions, support phytostabilisation in As-mine soils under Mediterranean conditions.

Financiación - Fundings

Esta tesis ha sido financiada por los siguientes **proyectos de investigación**:

- Fitorrecuperación de suelos contaminados por metales pesados. Selección de especies vegetales y de bioindicadores de estrés (FISUCO). MEC, 2004-2007.
 - Evaluación del impacto ambiental y recuperación del medio natural en emplazamientos contaminados. CM, S-0505/AMB/000296. 2006-2009.
 - Actuación combinada de fitoextracción, fitoestabilización y revegetación de suelos contaminados por residuos mineros (ACOFI). MEC, 2007-2010.
-

All the studies detailed in the current PhD document were financed by these **researching projects**:

- Phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Selection of plant species and stress bioindicators (FISUCO). CTM 2004-06715-CO2-01, Spanish Ministry of Education and Culture, 2004-2007.
 - Evaluation of environmental impact and site recovery of contaminated environments. Madrid Community, S-0505/AMB/000296. 2006-2009.
 - Combination of phytoextraction, phytostabilization and revegetation for mine spill contaminated soils (ACOFI). CTM 2007-66401-CO2-02, Spanish Ministry of Education and Culture, 2007-2010.
-

Los autores agradecen al Ayuntamiento de Bustarviejo por el permiso para la admisión a la zona de la mina y las facilidades ofrecidas, y a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía por permitirnos realizar nuestros estudios en la finca "El Vicario".

Publicaciones derivadas de la tesis – Publications

Moreno Jiménez, E., Carpena-Ruiz, R.O., Peñalosa, J.M., Esteban, E., 2006. Efectos tóxicos de arsénico y mercurio en plantas de *Rosmarinus officinalis*. Nutrición Mineral. Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales. En: Lamfus, C., Ed. Pamplona, pp. 623-630. ISBN 84-9769-165-4.

Vázquez, S., Moreno, E., Carpena, R.O., 2008. Bioavailability of metals and As from acidified multi-contaminated soils: validation of several extraction methods by lupin plants. Environmental Geochemistry and Health 30: 193-198.

Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Carpena-Ruiz, R.O., Esteban, E., 2008. Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. Chemosphere 71: 466-473.

Moreno-Jiménez, E., Esteban, E., Carpena-Ruiz, R.O., Peñalosa, J.M., 2009. Arsenic- and mercury-induced phytotoxicity in the Mediterranean shrubs *Pistacia lentiscus* and *Tamarix gallica* grown in hydroponic culture. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1781-1789.

Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Esteban, E., Bernal, M.P., 2009. Feasibility of arsenic phytostabilisation using Mediterranean shrubs: impact of root mineralization on As availability in soils. Journal of Environmental Monitoring 11: 1375-1380. In collaboration with the Grupo Sostenibilidad del Sistema Suelo-Planta, CEBAS-CSIC, Murcia.

Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Manzano, R., Carpena-Ruiz, R.O., Gamarra, R., Esteban, E., 2009. Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. Journal of Hazardous Materials 162: 854-859.

Moreno-Jiménez, E., Manzano, R., Esteban, E., Peñalosa, J.M., 2010. The fate of aresnic in soils adjacent to an old mine site (Bustarviejo, Spain): mobility and transfer to native flora. Journal of Soils & Sediments 10: 301-312.

Los datos de los Capítulos 6 y 7 están en fase de elaboración de la publicación.

Publications derived from results of Chapters 6 and 7 are under elaboration.

A mis padres, mi familia y los amigos.

A mi madre.

Agradecimientos

Tengo mucho que agradecer a la gente que me rodea en la elaboración de esta tesis porque sin su ayuda no hubiera sido posible. Espero que todos los implicados os sintáis parte de ella.

En primer lugar, me gustaría agradecer el apoyo de la gente del Departamento. Tanto Jesús como Elvira han aportado supervisión, conocimientos, apoyo y calor. Especialmente me gustaría agradecerles la confianza que han tenido en mí, lo que ha permitido que todos nos sintamos cómodos en el desarrollo de mi formación. Saúl, Ana, María Jesús, Teresa y Rebeca han estado a mi lado en el laboratorio y me han aguantado y ayudado. Ramón, Pilar y Beatriz han sido también parte activa como integrantes del Grupo de Investigación “C-129 Metales Pesados en Plantas. Fitorremediación.” UAM. El Dr. Roberto Gamarra (UAM) ha estado implicado en muchos de nuestros estudios, y queríamos agradecerle su asesoramiento botánico. Especial ilusión me hace agradecer a Iván y Diego, que empezaron conmigo y hemos acabado casi al mismo tiempo. También a Patricia, que ha sufrido mis conversaciones. Los del 202 han ayudado siempre que ha sido necesario, Sandra, Paloma, Edgar, Elena, Sonia y María Prieto, y el comodín Carlos. La gente del Departamento: Agustín, Enrique, Esperanza, María, Nadia, Vanesa, Yolanda, etc. Han pasado muchos proyectos que estuvieron en contacto conmigo: Rodrigo, Hortensia, Roberto, Carol, América, Dani, Ramsy, Ana, Silvestre y Carmen. Otro personal de la UAM me ha asistido cuando les he necesitado: Luis Eduardo Hernández, Victoria Cala, Inmaculada Rivas, Ildefonso Bonilla, etc. También ha colaborado gente del IMIDRA (Carmen, Araceli), INIA (Loli), CIEMAT (Rocío, María José, Sandra), y CEBAS-CSIC (Pilar, Carlos, Isabel, Tania). No puedo olvidar la gente que me rodeó en Liverpool: Will, Shaun, Nadia, Mo, Nick Dickinson y, especialmente, Nick Lepp y Luke Beesley. También he conocido gente en congresos que me han acogido en su casa (Adrien y Jakob) o entre sus planes (Paula y Engracia). Agradecer especialmente a Rafa, con el que me une Liverpool, congresos, colaboraciones, artículos, conversaciones, etc. Ha sido un placer disfrutar de la ayuda de todos durante esta experiencia.

Sin embargo la tesis no hubiera sido posible sin la participación de toda la gente que me rodea fuera del ámbito laboral, que me permite airear la mente cuando es necesario y me dan el calor necesario para seguir. Los de Fuenlabrada de toda la vida, los de ambientales y los de la montaña han aportado frescura y alivio en momentos de ofuscación. Aquellos que conocí en Liverpool hicieron más fácil mi estancia allí (Stephen, Shanti,...). Víctor, al que considero un hermano y que anda esperando mis visitas más sosegadas a Dublín. Por último, y quizá por ello los más importantes, mi familia. Mis abuelos que se sienten orgullosos de todo lo que hago, mis tíos que siempre estarán ahí, y mis primos y consortes que siempre han ejercido el papel de hermanos. Como no a mi padre, que me sufre en casa y ha puesto su granito de arena en la tesis y ha aguantado los estreses. Para acabar, un recuerdo para la persona que más ha impulsado mi vida, mi formación y me ha dado todo el cariño que he necesitado y necesitaré, mi madre, a la que echo de menos todos los días pero de cuyo recuerdo me da fuerzas para todo lo que hago.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	7
1.1 PROPIEDADES QUÍMICAS DEL ARSÉNICO.....	7
1.2 ARSÉNICO EN EL AMBIENTE.	9
1.3 DINÁMICA DEL ARSÉNICO EN EL SUELO.	13
1.4 ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE ARSÉNICO EN LAS PLANTAS.....	25
1.5 TOXICIDAD.....	31
1.6 RESISTENCIA.....	35
1.7 EL PAPEL DE LAS PLANTAS EN LA RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS Y DEGRADADOS. SUELOS MINEROS ARSENOPIRÍTICOS.	40
2. OBJETIVOS - OBJECTIVES.....	57
3. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	61
i) BIODISPONIBILIDAD DE METALES Y ARSÉNICO EN UN SUELO ÁCIDO CONTAMINADO: USO DE ALTRAMUZ PARA VALIDAR LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.	61
Materiales y métodos.....	61
Resultados.....	64
Discusión.....	67
Conclusiones.....	68
ii) MÉTODOS DE DIGESTIÓN PARA EXTRAER ARSÉNICO DE MUESTRAS DE SUELO Y PLANTA.	69
Materiales y Métodos.....	69
Resultados y discusión.....	70
Conclusión.....	72
4. COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA AL ARSÉNICO DE VARIOS ARBUSTOS MEDITERRÁNEOS FRECUENTEMENTE UTILIZADOS EN TAREAS DE REVEGETACIÓN.....	75
Materiales y Métodos.....	75
Resultados.....	81
Discusión.....	92
5. IMPACTO DE LA MINERALIZACIÓN DE RAÍCES EN LA DISPONIBILIDAD DE ARSÉNICO EN SUELOS. IMPLICACIONES EN FITOESTABILIZACIÓN DE SUELOS UTILIZANDO ESPECIES ARBUSTIVAS MEDITERRÁNEAS.....	99
Materiales y Métodos.....	99

Resultados	101
Discusión	106
6. ENSAYO DE FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR LODOS PIRÍTICOS CON ESPECIES ARBUSTIVAS MEDITERRÁNEAS. EFECTOS SOBRE LA CALIDAD DEL SUELO.	113
Materiales y Métodos	113
Resultados y Discusión.....	118
7. FITORREMEDIACIÓN DE ZONAS AFECTADAS POR CONTAMINACIÓN RESIDUAL ARSENOPIRÍTICA. ESTUDIO DE CAMPO.....	141
Materiales y Métodos	141
Resultados	144
Discusión	149
Conclusiones	155
8. DISPERSIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN LOS SUELOS CERCANOS A UNA MINA DE ARSENOPIRITA EN BUSTARVIEJO (MADRID). TRANSFERENCIA A PLANTAS Y AGUAS.	159
Materiales y Métodos	159
Resultados	162
Discusión	169
9. CONSIDERACIONES FINALES.	177
10. CONCLUSIONES - CONCLUSIONS.	183
REFERENCIAS.....	187

Introducción y Antecedentes

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 PROPIEDADES QUÍMICAS DEL ARSÉNICO

El arsénico es un elemento perteneciente al grupo V-A de la tabla periódica, de número atómico 33 y peso atómico 74,92 (Figura 1). Se presenta en estado sólido principalmente en forma de sulfuros. Por su posición en dicho grupo, muestra propiedades intermedias entre los metales y los no metales (metaloide), aunque por su electronegatividad y energía de ionización predominan las características de no metal y forma más fácilmente aniones que cationes. Por su posición en la tabla periódica, este elemento presenta un comportamiento químico similar al del fósforo, hecho que conlleva múltiples implicaciones tanto a nivel edáfico como sobre la toxicidad del arsénico para las plantas.

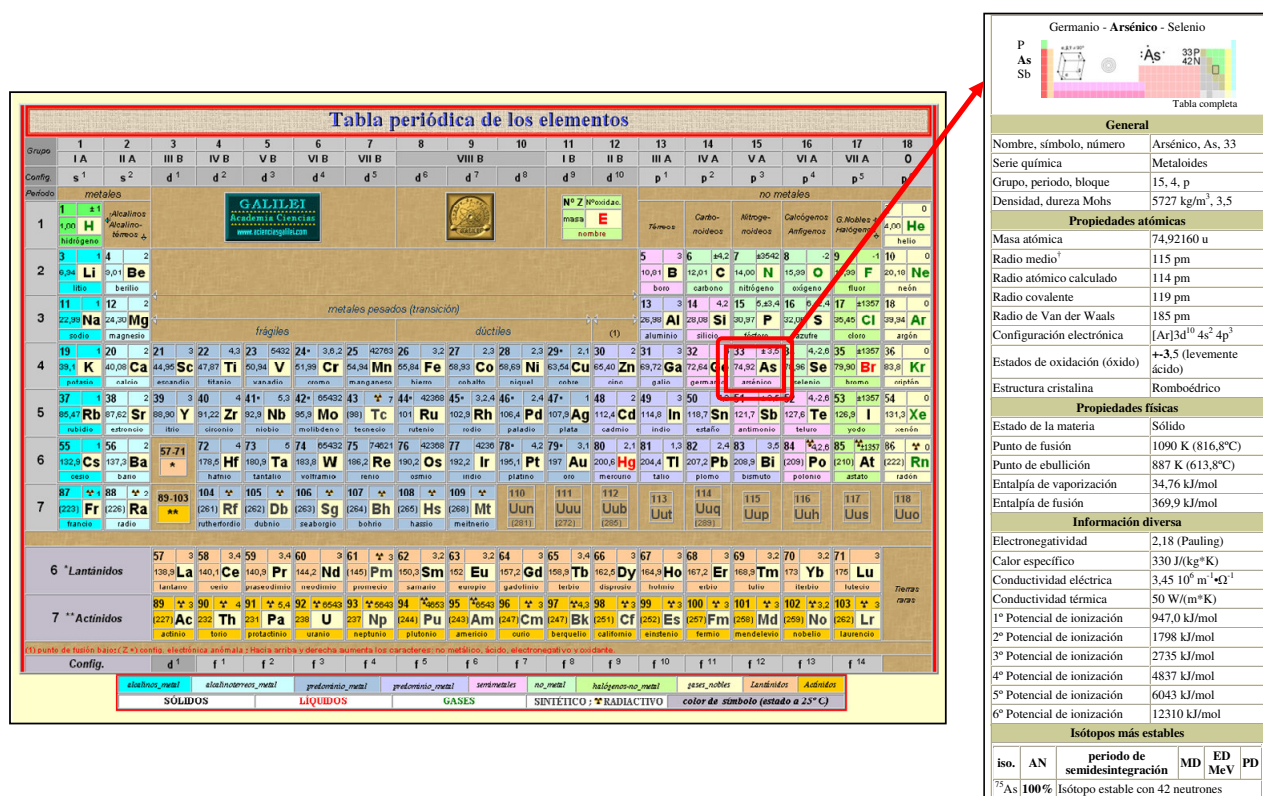


Figura 1. Posición del arsénico (As) en la tabla periódica y propiedades del elemento.

El arsénico se suele unir covalentemente con la mayoría de metales y no metales y puede formar parte de moléculas orgánicas estables (Barán, 1995). Los estados de oxidación del As más comunes son -3, 0, +3 y +5. Las arsinas y las metilarsinas se corresponden con el estado de oxidación -3 y son inestables en condiciones oxidantes. El arsénico elemental se forma por la reducción de los óxidos de arsénico. El arsénico con numero de oxidación +3, que se produce en las actividades de fundición, puede ser oxidado catalíticamente o por bacterias a pentaóxido de arsénico, As⁺⁵ o a ácido ortoarsénico, H₃AsO₄.

La Figura 2 representa el diagrama Eh-pH para el sistema As-H₂O-O₂. En un medio aeróbico el estado de oxidación dominante es el +5 y para valores de pH hasta 2 el arsénico aparece como H₃AsO₄. Entre 2 y 11 este compuesto aparece disociado en H₂AsO₄⁻ y HAsO₄²⁻.

Para valores más bajos de Eh, medio reductor, el estado de oxidación que domina es +3. El arsénico bajo la forma de As₂S₃, se forma en presencia de azufre o de sulfuro de hidrógeno.

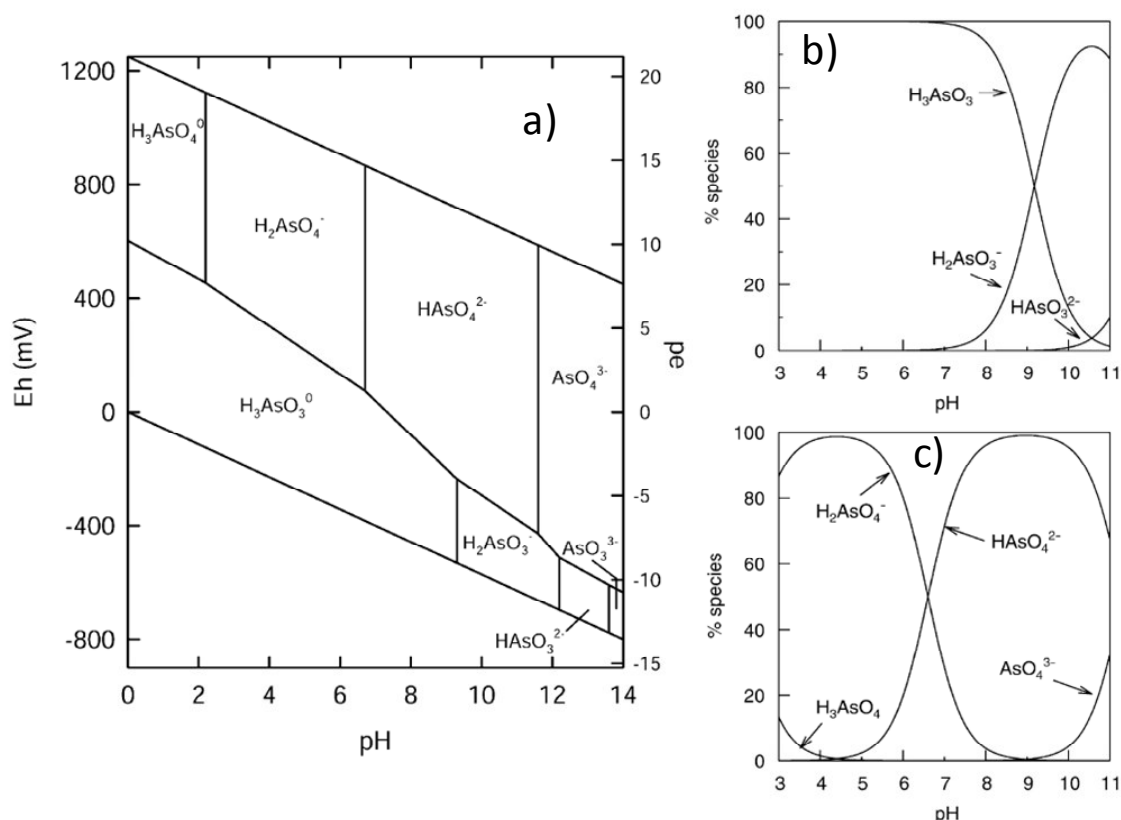


Figura 2. Especies predominantes de arsénico: (a) Diagrama de especiación del arsénico en función del pH-Eh en el sistema As-O₂-H₂O a 25 °C y 1 bar; Especiación química de arsenito (b) y arseniato (c). Obtenido de Smedley and Kinniburgh (2002).

En condiciones normales, las constantes de ionización del ácido arsénico son $pK_{a1}=3,6$; $pK_{a2}=7,0$; $pK_{a3}=12,5$, mientras que el arsenioso tendría $pK_{a1}=9,2$ (Burriel y col., 1999).

Por otra parte, es bien conocida la facilidad con que se constituyen enlaces As-C, lo que ha dado origen a una enorme cantidad de compuestos organoarsenicales, siendo uno de los elementos que más fácilmente se biometila (Barán, 1995).

1.2 ARSÉNICO EN EL AMBIENTE.

El arsénico es un elemento ampliamente distribuido en el ambiente. Suele ser detectable en casi todos sus compartimentos y generalmente aparece en la litosfera en concentraciones entre 1,5 y 2 ppm, ocupando el puesto 52 en abundancia (Adriano, 2001). Forma parte de más de 245 minerales en forma de arseniatos (60%), sulfuros y sulfosales (20%) y otras formas como arseniuros, arsenitos, óxidos y silicatos (20%) (Mandar y Suzuki, 2002). Los mayores depósitos de As de la corteza terrestre se encuentran en forma de piritita, galena, calcopirita, y esfalerita. Existen altas concentraciones en depósitos de azufre como por ejemplo As_2S_3 , AsS , FeAsS , FeAs_2 , razón por la que la arsenopirita ha sido utilizada para la obtención de arsénico a lo largo de la historia, al ser el mineral de As más abundante en la naturaleza (Smedley and Kinniburgh, 2002). La Figura 3 esquematiza el ciclo del As en el medio ambiente.

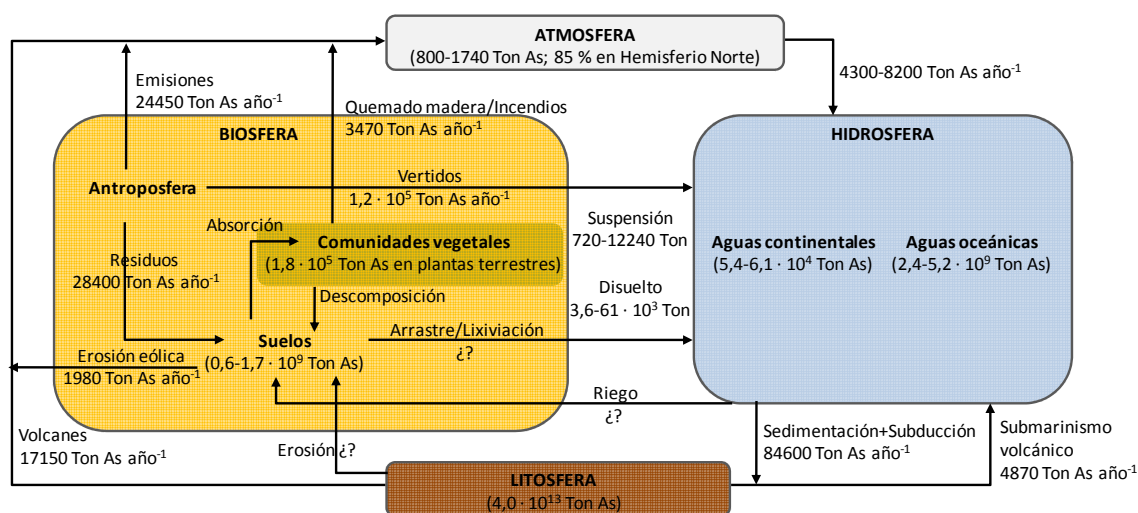


Figura 3. Esquema general del ciclo biogeoquímico del As en la geosfera: flujos y principales reservorios. Modificado de Matschullat, 2000.

El arsénico inorgánico está presente en suelo, agua, aire y alimentos, de forma que el ser humano se encuentra continuamente expuesto a este contaminante (Mandal y Suzuki, 2002). Aunque existen técnicas que permiten una determinación semicuantitativa de As en muestras sólidas, el arsénico en muestras ambientales sólidas (como por ejemplo suelos y plantas) suele medirse en un extracto después de realizar una extracción fuerte, frecuentemente con un ácido y en condiciones oxidantes a altas presiones y temperaturas.

El intervalo de arsénico en el suelo varía de 0,2 a 40 g kg⁻¹ y en el aire de las zonas urbanas la concentración es aproximadamente de 0,02 µg m⁻³ de aire. La exposición vía consumo de agua es la mayoritaria a escala global. En aguas continentales la concentración suele estar por debajo de 1 µg L⁻¹ (Smedley y Kinniburgh, 2002), mientras en el agua marina la media de la concentración de As está en torno a 1,5 µg L⁻¹ (Biessen y Frimmel, 2003). La mayor exposición al arsénico es debida al agua superficial

contaminada de origen antropogénico o geológico. Se estima que unos treinta millones de personas están expuestas a agua contaminada con arsénico, y un cuarto de estos presentan síntomas derivados de una exposición aguda en al menos cinco países del sureste asiático: Bangladesh, India, Nepal, Tailandia y Myanmar (Caussy, 2003). La Organización Mundial de la Salud recomienda un nivel máximo de arsénico de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en agua (Bissen y Frimmel, 2003) y, sin embargo, la concentración de arsénico en aguas superficiales excede de $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ en determinadas áreas de Bangladesh y de la India (Tripathi et al., 2007). Tanto el suelo como el agua de un emplazamiento son una de las principales vías de exposición a arsénico para los seres vivos, ya sea por ingesta (principalmente para niños, Rodríguez y col., 2003), inhalación o contacto dérmico (DEFRA, 2002). Otra vía determinante de exposición es el paso del arsénico a la cadena trófica: el arsénico se acumula en cultivos, vegetales y frutas que crecen en suelos contaminados (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). Como regla general, los organismos marinos muestran mayor concentración de As que los terrestres. Por ello, los alimentos de origen vegetal y animal terrestres presentan contenidos de As relativamente bajos, mientras que los de origen marino presentan contenidos más elevados. El arsénico se encuentra dentro del grupo de los oligoelementos como elemento esencial minoritario, con función biológica durante la fosforilación en animales (Derache, 1990). Las concentraciones se deben mantener en el organismo en niveles relativamente bajos ($\mu\text{g g}^{-1}$ - ng g^{-1}). La ingestión continuada de arsénico durante largos periodos de tiempo, deriva en la manifestación de sus efectos tóxicos, produciéndose cambios fisiológicos y desórdenes estructurales. Las formas inorgánicas son más tóxicas, en general, que las orgánicas, aunque estas últimas se absorben mejor. Las personas que no suelen estar expuestas a compuestos de As pueden morir con la ingesta de $0,1\text{-}0,3 \text{ g día}^{-1}$. En cambio, personas que hayan sufrido una exposición crónica pueden resistir hasta 1 g día^{-1} de H_3AsO_3 sin manifestar ningún tipo de efecto negativo sobre la salud (Biessen y Frimmel, 2003). La exposición laboral al arsénico está presente en ciertos trabajos relacionados con la minería, la combustión de carbón rico en As, uso de conservantes para la madera, producción y uso de pesticidas.

Las fuentes de arsénico pueden ser clasificadas en función de su origen (naturales o antropogénicas) o de su distribución espacial (localizadas o difusas).

Fuentes naturales de arsénico (fondo geoquímico)

Las fuentes de origen natural engloban aquellas que implican el aporte sin intervención humana significativa. Incluso antes de que las actividades humanas tuvieran efectos sobre los ciclos de los elementos, el arsénico estaba presente en la corteza terrestre, suelos, sedimentos, aguas, aire y organismos. Por regla general estas fuentes dependen íntimamente de la geoquímica de un emplazamiento (de su litología principalmente y de las vías de dispersión). El fondo geoquímico de una sustancia sería la concentración de la misma en un emplazamiento determinado atendiendo solamente a las fuentes naturales.

La concentración de As en suelos suele estar por debajo de 40 ppm y el fondo geoquímico depende de las distintas litologías, cuya concentración de arsénico varía de una a otra. En la Tabla 1 se detallan las concentraciones típicas de distintas litologías:

Tabla 1. Concentraciones típicas de As en función del material litogénico (Mandal y Suzuki, 2002).

Materiales	Arsénico (mg kg⁻¹)
<u>Ígneos</u>	
<i>Ácidos</i>	
Extrusivos (riolitas)	3,2-5,4
Intrusivos (granitos)	0,18-15
<i>Intermedios</i>	
Extrusivos (latitas, andesitas)	0,5-5,8
Intrusivos (diorita, granodiorita)	0,09-13,4
<i>Básicos</i>	
Extrusivos (basaltos)	0,18-113
Intrusivos (gabros)	0,06-28
<i>Ultrabásicas</i>	
Peridotitas, dunitas, serpentinas	0,3-15,8
<u>Metamórficos</u>	
Cuarcitas	2,2-7,6
Pizarras/filitas	0,5-143
Esquistos/gneises	0,0-18,5
<u>Sedimentarios</u>	
<i>Marinos</i>	
Arcillas y limos	3-490
Carbonatos	0,1-20,1
Fosforitas	0,4-188
Arenas	0,6-9
<i>No marinos</i>	
Limos	3,0-12
Arcillas	3,0-10
<i>Sedimentos recientes</i>	
Limos	3,2-60
Arcillas	4,0-20
Carbonatos	<1,0
Ríos y torrentes	5,0-4000
Lagos	2,0-300
Suelos	<0,1-97

Los depósitos de arsénico en algunos materiales de la corteza terrestre son importantes y fruto de ello encontramos litologías en las que la concentración de As es elevada, suponiendo una importante fuente para el ambiente colindante. Son especialmente altos los valores de arsénico en determinadas litologías ricas en arsenopirita, donde la concentración de As puede alcanzar más de 10000 ppm (1%). En estas zonas podría existir riesgo tanto para la salud y como para el ecosistema, por lo que habría que aplicar medidas de gestión del emplazamiento si fuesen necesarias. En algunos emplazamientos, la actividad volcánica también puede ser otra fuente importante de arsénico (Fitz y Wenzel, 2002).

Fuentes antropogénicas de arsénico

La producción mundial de arsénico se estima entre 75 y $100 \cdot 10^3$ toneladas anuales (Adriano, 2001). Las principales actividades humanas fuentes de As son la minería, la siderurgia, la agricultura, la silvicultura, las plantas de tratamiento de combustibles fósiles, los desechos urbanos y la ganadería (Adriano, 2001; Cullen y Reimer, 1989; Fitz y Wenzel, 2002). En los procesos de minería y siderurgia el arsénico se presenta frecuentemente como un subproducto con poco mercado, lo que ocasiona que se convierta en residuo. Se presentan concentraciones elevadas de As en las cercanías de los escombros mineros (hasta 3% As), que decrece rápidamente con la distancia a dichos escombros (Zhang y Selim, 2008). La formulación de numerosos plaguicidas, fungicidas y biocidas utilizados para controlar enfermedades en cultivos tanto agrícolas como forestales solían contener As (Lepp, 1981). A su vez, algunos fertilizantes pueden suponer un aporte de arsénico al suelo (Matschullat, 2000). Los residuos urbanos que derivan en la obtención de lodos de depuradora y compost, que son usados ocasionalmente como enmiendas orgánicas de suelos, pueden contener arsénico en cantidades variables. Por último, los combustibles fósiles contienen también concentraciones de arsénico que pueden provocar a largo plazo un enriquecimiento en la zona afectada por los gases originados en la combustión. Todo ello provoca una liberación del elemento al ambiente y puede enriquecer los suelos en As.

Fuentes en función de su distribución espacial

Existen dos tipologías en función del grado de confinamiento de la fuente (Moreno y col, 2007). Así, cuando el foco es puntual y fácilmente delimitables sus límites hablamos de fuentes localizadas. Éstos focos pueden coincidir con instalaciones de actividades humanas (p.ej., vertederos o industrias) o zonas muy localizadas de depósitos minerales de arsénico. Como es obvio, al tener la fuente identificada es más fácil estudiar la contaminación y actuar sobre ella. Por el contrario las fuentes difusas ocupan vastas extensiones de territorio y sus límites son difíciles de establecer o incluso variables. Entre ellas podríamos incluir grandes anomalías litogénicas enriquecidas en arsénico o zonas agrícolas extensas (ya sea por la

utilización de biocidas o por el uso de aguas contaminadas para riego). En estos casos las actuaciones requeridas para conocer y abordar la contaminación serán más complejas.

1.3 DINÁMICA DEL ARSÉNICO EN EL SUELO.

El suelo es un sistema vivo y dinámico, heterogéneo en su estructura y funciones biológicas, aunque homogéneo en su equilibrio (Lobo, 2007). Sus principales componentes son las partículas minerales, las orgánicas, los organismos que en él viven (desde microorganismos a plantas y vertebrados), el agua y los gases. El suelo es en muchos países el principal recurso natural del que dependen la agricultura, la ganadería y, por tanto, la alimentación. Podríamos decir que el suelo se encuentra en la interfase entre biotopo y biocenosis, pero también entre litosfera, hidrosfera y atmósfera. Es un componente clave en el ecosistema que regula y gobierna las relaciones entre sus componentes, de modo que tiene un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los elementos y el agua. Más allá de ser el soporte físico en el que se desarrolla la actividad sobre la tierra, el suelo había sido ignorado hasta hace poco tiempo a pesar de ello su importancia. Por ello ha sufrido importantes impactos sin tener en cuenta las consecuencias. Recientemente (hace unas tres décadas) hemos empezado a tener conciencia de la importancia del suelo en el equilibrio ambiental y han empezado a surgir políticas para conservarlo y recuperarlo. Por poner un ejemplo es el único compartimento ambiental que no posee un marco legislativo específico de protección a nivel europeo aún, a pesar de los intentos y esfuerzos que han permitido elaborar una propuesta de Directiva Marco derivada de una Estrategia Temática de Protección del Suelo (COM (2006) 231 final).

Entre las funciones del suelo podemos citar estas como las más importantes: (i) producción de biomasa, (ii) regulación ambiental, (ii) reciclaje de materias primas, (iv) hábitat para organismos, (v) reserva genética, (vi) sustento físico para la actividad, (vii) fuente de materias primas y agua, (viii) preservación de la herencia cultural. El concepto calidad del suelo estaría relacionado con estas funciones y podría definirse como “la capacidad del suelo para funcionar dentro de los límites de su ecosistema, con el fin de mantener la productividad biológica, calidad ambiental y promover la salud de los seres vivos” (Doran y Parkin, 1994; Trasar-Cepeda y col., 2000). En resumen, es la capacidad de un suelo para desarrollar sus funciones. Muchos autores han hecho un esfuerzo por integrar índices para medir la calidad ambiental de los suelos. Aunque estos índices son variados, coinciden en el uso de varios indicadores que apuntan fundamentalmente a parámetros químicos (pH, materia orgánica, nutrientes, contaminantes...), físicos (textura, porosidad, aireación...) y biológicos (diversidad, cantidad de organismos, actividades enzimáticas, presencia de cubierta vegetal...) (Trasar-Cepeda y col., 2000; Pereira y col., 2008). Básicamente la integración de todos estos parámetros indicará la calidad de un suelo.

Por otro lado, el término degradación del suelo sería la reducción de la capacidad actual y/o futura del suelo para producir, en términos de calidad o cantidad, bienes y servicios (Dregne, 1987). La

degradación puede ser también química (contaminación, acidificación, salinidad...), física (erosión, compactación...) o biológica (entrada de patógenos o especies invasoras...). Un tipo de degradación del suelo al que se viene prestando gran interés por su magnitud e importancia en alimentación y salud del ecosistema sería la contaminación por compuestos químicos (Pérez de Mora y col., 2008a-b). Estos compuestos pueden ser tanto orgánicos como inorgánicos. Los indicadores de la calidad del suelo se ven afectados por la presencia de elementos traza y así su determinación se ha utilizado en investigación para establecer grados de contaminación y de recuperación de las funciones de un suelo después de haber recibido un impacto. Por ejemplo, el pH, el contenido en nutrientes (C y N) y contaminantes y las actividades enzimáticas han sido usadas para estos fines (Sastre-Conde y col., 2007; Epelde y col., 2008a-b; Pérez-de-Mora y col., 2008a-b). La presencia de distintas especies de arsénico en suelos es capaz de comprometer su calidad y por tanto modificará todos estos parámetros en función del grado de riesgo que presente para el suelo.

Como se ha descrito anteriormente, la presencia de arsénico en el suelo debida a su abundancia en la corteza terrestre suele ser detectable por diversos métodos analíticos. Algunos autores han propuesto concentraciones de fondo de As en suelo de hasta 10-40 mg kg⁻¹ en zonas sin anomalías litológicas (Fitz y Wenzel, 2002; Mandal y Suzuki, 2002), estimándose una concentración media en la pedosfera de 5-8 mg kg⁻¹ (Matschullat, 2000). En Andalucía se han descrito valores de hasta 33 mg kg⁻¹ As, aunque dependiendo del horizonte, tipo de suelo y litología (Martín y col., 2007). Singularmente existen zonas que por motivos naturales o antropogénicos muestran niveles extraordinariamente altos de arsénico en suelos, con unas concentraciones entre 0,1 y 2% de As en los suelos (Chang y col., 2005; Ongley y col., 2007; Antosiewicz y col., 2008; King y col., 2008). En la legislación ambiental suelen utilizarse los niveles de arsénico total como criterio para estudiar el As en el suelo (que son los que se han estado detallando hasta ahora en este documento). Sin embargo, en numerosas ocasiones se ha comprobado como el contenido total de un elemento traza extraído mediante digestiones ácidas es un pobre indicador de su movilidad, potencial transferencia y riesgo (Allen, 2001). Otro aspecto a tener en cuenta en el estudio de la presencia de As en los suelos es la gran heterogeneidad con la que suele aparecer, de modo que habrá zonas con altas concentraciones de arsénico colindantes con otras mucho menos afectadas. Esos puntos calientes de contaminación deben ser identificados ya que serán los más problemáticos en la gestión (Dickinson y col., 2009). Varios autores han descrito niveles de As mayores en los horizontes superficiales (Adriano, 2001; Clemente y col., 2008), lo que indicaría una contaminación posterior a la génesis del suelo. Pero este fenómeno dependerá obviamente de la fuente y del modo en que se produzca la entrada de arsénico al suelo. En una revisión realizada por Fitz y Wenzel (2002) se describe que en la Unión Europea podrían existir 1,4 millones de suelos contaminados (teniendo en cuenta que en el momento del estudio solo estaba formada por 15 de los 27 estados actuales) por metales, metaloides y/o compuestos orgánicos. Además, estos autores estiman que en EEUU en torno al 41% de los suelos incluidos en el catálogo de contaminados como mínimo lo era a causa del As y que en Australia existen 10000 suelos contaminados por As. Algunos de estos suelos comprenden extensas áreas de afección, es decir, existen zonas

Movilidad y solubilidad de As en el suelo

```

graph LR
    SUELO --- MATERIAL_ORIGINARIO[MATERIAL ORIGINARIO]
    MATERIAL_ORIGINARIO --> PARTICULA[PARTÍCULA]
    MATERIAL_ORIGINARIO --> COLOIDES[COLOIDES]
    PARTICULA --> MINERALES_PRIMARIOS[MINERALES PRIMARIOS]
    PARTICULA --> MINERALES_SECUNDARIOS[MINERALES SECUNDARIOS]
    COLOIDES --> INORGANICOS["INORGÁNICOS  
(Óxidos de Fe, Mn, Al)"]
    COLOIDES --> ORGANICOS["ORGÁNICOS  
(Ác. húmicos y fúlvicos)"]
    SOLUBLE[SOLUBLE] --> COMPLEJOS[COMPLEJOS]
    SOLUBLE --> IONES_LIBRES[IONES LIBRES]
    MINERALES_PRIMARIOS --> Fase_sólida1[Fase sólida]
    MINERALES_PRIMARIOS --> Adsorbidos1[Adsorbidos en superficie]
    MINERALES_SECUNDARIOS --> Fase_sólida2[Fase sólida]
    MINERALES_SECUNDARIOS --> Adsorbidos2[Adsorbidos en superficie]
    INORGANICOS --> Ocluidos1[Ocluidos]
    INORGANICOS --> Adsorbidos3[Adsorbidos en superficie]
    ORGANICOS --> Ocluidos2[Ocluidos]
    ORGANICOS --> Adsorbidos4[Adsorbidos en superficie]
    COMPLEJOS --> Ligandos_organicos[Ligandos orgánicos]
    IONES_LIBRES --> Ligandos_inorganicos[Ligandos inorgánicos]
    Fase_sólida1 --> ABSORCION[Absorción]
    Adsorbidos1 --> ABSORCION
    Fase_sólida2 --> ABSORCION
    Adsorbidos2 --> ABSORCION
    Ocluidos1 --> ABSORCION
    Adsorbidos3 --> ABSORCION
    Ocluidos2 --> ABSORCION
    Adsorbidos4 --> ABSORCION
    Ligandos_organicos --> ABSORCION
    Ligandos_inorganicos --> ABSORCION
    ABSORCION --> PLANTA[PLANTA]
  
```

En la retención de elementos tóxicos en la matriz del suelo participan una serie de procesos biogeoquímicos de considerable complejidad y fuertemente interrelacionados con las propiedades químicas,

físicas y biológicas del suelo. Estos procesos controlan la solubilidad, biodisponibilidad, movilidad y toxicidad de los elementos (Sparks, 1995,2005; Adriano, 2001). Entre ellos destacan los siguientes:

1. Absorción por la planta.
2. Retención en la superficie de la materia orgánica y de los coloides del suelo (arcillas, óxidos, etc).
3. Transporte a través del perfil del suelo, vía lixiviación o mediante el transporte asociado a los coloides.
4. (Re)precipitación como una nueva fase en el suelo.
5. Difusión a través de los microporos presentes en la matriz del suelo.
6. Solubilización en la solución del suelo.
7. Interacciones con microorganismos a través de reacciones redox y de metilación.

Como regla general los elementos traza en los suelos se pueden encontrar en distintas formas, más o menos retenidos en su matriz. Así los vamos a tener en forma soluble, en forma intercambiable (asociados a los complejos de cambio de arcillas, materia orgánica...), retenidos en óxidos y oxihidróxidos (principalmente de Fe, Mn y Al), asociados a la materia orgánica del suelo, unidos a carbonatos e incluso en la estructura mineral (fracción residual). La Tabla 2 resume el fraccionamiento de elementos traza en el suelo.

Tabla 2. Formas de retención en el suelo de elementos traza y disponibilidad relativa (Cala, 1995).

Forma de retención en el suelo	Disponibilidad relativa
Ión en la solución del suelo	Fácilmente disponibles
Ión en el complejo de cambio	Relativamente disponibles
Elemento quelado por compuestos orgánicos	Menos disponibles
Elemento precipitado o coprecipitado	Disponible sólo si ocurre alguna alteración química
Elemento en la estructura mineral	Disponible sólo después de la meteorización
Incorporado a la matriz biológica	Disponible después de la descomposición

Para el estudio del fraccionamiento de elementos traza en el suelo se han utilizado clásicamente metodologías de extracción secuencial. En el caso particular del arsénico, que se presenta en forma aniónica en los suelos, se han adaptado estos métodos, de forma que existen protocolos específicos para arsénico (Oken y Adriano, 1997; Shiwatana et al., 2001; Wenzel et al., 2001), lo que ha permitido desvelar que el arsénico se encuentra a menudo asociado a óxidos e hidróxidos en los suelos (McLaren y col., 2006). Las superficies de intercambio de los silicatos y la materia orgánica suelen estar cargadas negativamente, por lo que tienen mayor tendencia a retener cationes. En algunos suelos y a pH bajos (con predominio de cargas positivas), podrían darse las condiciones apropiadas para la retención de As en posiciones de intercambio. En suelos afectados por materiales piríticos o suelos asociados a minería pirítica

el arsénico también se encuentra en alta proporción en la fracción residual, indicativo de que se encuentra en forma mineral (p.ej. asociado a sulfuros).

El estudio del fraccionamiento de los elementos traza en los suelos nos va a proporcionar información sobre la movilidad, migración y el riesgo de toxicidad. Todas estas variables están íntimamente relacionadas con el concepto de biodisponibilidad, que genéricamente podría definirse como “la fracción de contaminante en el suelo que es susceptible de interactuar con los organismos vivos”. La fracción retenida de forma lábil en la matriz del suelo (suelo y agua) será la fracción biológicamente más activa (fracción biodisponible) y más móvil (fracción soluble). La fracción disponible de los contaminantes en la matriz del suelo es la más importante desde el punto de vista ecológico y toxicológico y debería ser un indicador en normativas referente a evaluar el riesgo de la presencia del contaminante en un suelo (Mench y col., 2009). Todavía no existe un consenso claro sobre el concepto de biodisponibilidad ni una manera precisa de abordarla. En el caso de las plantas y el arsénico sería “la cantidad de As que una planta toma de un suelo”, pero este concepto aún no ha podido ser medido y no permite realizar ninguna predicción (Fitz y Wenzel, 2006). Por ello suele utilizarse también la aproximación de que el elemento disponible es aquella fracción en el suelo que podría ser potencialmente absorbido por una planta u organismo. Aplicado a elementos traza en suelos se ha utilizado frecuentemente el concepto de disponibilidad para la plantas (fitodisponibilidad). Ésta sería la concentración de elemento que potencialmente una planta puede absorber del suelo, que clásicamente se ha estimado mediante la correlación del elemento en el suelo respecto a lo analizado en las plantas que crecen sobre él (Feng y col., 2005; Vázquez y col., 2008a). Sin embargo es un concepto bastante complejo que aún no se ha podido abordar de forma definitiva, ya que en muchos casos se obvia que la disponibilidad es un concepto dinámico que depende de muchos factores, no solo del suelo, sino del sistema suelo-planta-rizosfera-ambiente (Menzies y col., 2006). Las fracciones disponible y no disponibles de los contaminantes en el suelo suelen estar en equilibrio, pero cualquier cambio en factores ambientales (pH, Eh, clima, hidrología, biología, materia orgánica...) y la alteración de minerales (disolución-precipitación; oxidación-reducción; complejación-disociación; adsorción-desorción) puede alterar las reservas de elemento disponible (Mench y col., 2009). A pesar de dejar de lado este dinamismo, muchos métodos que analizan el suelo han mostrado resultados interesantes en la estimación del elemento potencialmente disponible para la planta. Todos los métodos de evaluación del elemento disponible tienen en cuenta que no es la totalidad del elemento en suelo la que está disponible para la planta, sino que las fracciones fuertemente retenidas no estarán a disposición de la absorción radicular. Así, no es tan importante la fase sólida del suelo, si no que serán importantes la fase líquida y el equilibrio del elemento entre las fases sólida y líquida del suelo (Sauvé, 2001). Clásicamente se venían utilizando métodos agresivos con agentes quelantes o ácidos diluídos, pero recientemente se ha comprobado que disoluciones de sales neutras o mezclas de ácidos orgánicos presentes en la rizosfera dan mejores resultados (Kabata-Pendias, 2004; Feng y col., 2005). Así, algunos métodos que utilizan sales neutras como extractantes (Kabata-Pendias, 2004) o mezclas de ácidos orgánicos (Feng y col., 2005) se correlacionaron satisfactoriamente con la concentración de elementos traza en forma catiónica (Zn, Cu, Cd,

Pb...) y aniónica (As). Recientemente han comenzado a usarse las rizosondas con el fin de monitorizar mediante el muestreo del agua intersticial del suelo esta fracción disponible (Clemente y col., 2008). Como se ha explicado anteriormente, el concepto de disponibilidad es dinámico debido a que en el suelo las distintas fracciones están en equilibrio, de forma que la fracción de arsénico asociada a (hidr)óxidos podría retener arsénico que se añada en forma soluble, pero también liberar arsénico a la solución del suelo. Lo que no se conoce suficientemente es la velocidad de intercambio entre las distintas fracciones, aunque parece ser lenta (Cattani y col., 2009).

Factores que condicionan la disponibilidad de As en el suelo

En el caso del arsénico, múltiples factores edáficos afectan a su disponibilidad, tanto para plantas como para organismos: parámetros químicos (pH, Eh, presencia de óxidos de Fe, fósforo, materia orgánica...), físicos (compactación, porosidad...), ambientales (clima, relieve...) y biológicos (cambios en la especiación). Todos estos factores van a condicionar el dinamismo y la complejidad del ciclo biogeoquímico del As en el suelo.

Efecto del pH

La carga total del suelo es igual a la suma de la carga permanente de los minerales de la arcilla procedente de las sustituciones isomórficas (cargas negativas) y de la carga dependiente del pH. Ésta última aparece en los oxihidróxidos de metales como Fe, Al y Mn, en los minerales de la arcilla y en la materia orgánica. Los grupos funcionales de los bordes de estos materiales se pueden protonar (cargados positivamente) o desprotonar (cargados negativamente) en función del pH. Según aumenta el pH del suelo, la desprotonación es más efectiva y es a un pH aproximadamente de 4 cuando esto ocurre en la materia orgánica. El punto cero de carga (PZC) de cada componente del suelo es un valor característico del pH por debajo del cual el componente del suelo se queda cargado positivamente (protonación) y por encima negativamente (desprotonación). Cuando están cargados positivamente (es decir, $\text{pH} < \text{PZC}$), estas superficies pueden retener aniones como el arseniato o el arsenito. Los óxidos de Fe tienen por regla general PZC altos (superior a 7 frecuentemente) y alta superficie específica (30-300 m² g⁻¹), lo que les identifica como moléculas propicias para la retención de aniones. Las arcillas por su parte tienen también alta superficie específica, pero su PZC suele ser más bajo (p. ej., 3 para la caolinita).

Muchos autores han descrito que un aumento de pH, en oposición con lo que pasa con elementos traza metálicos, moviliza el arsénico del suelo. Por regla general, un aumento de pH del suelo ocasiona un liberación de los aniones de las posiciones de cambio, por lo que tanto arseniato como arsenito se liberan (Smith y col., 1999; Fitz y Wenzel, 2002). Sin embargo existen experimentos que han mostrado que a altos pH y en presencia de sulfatos y carbonatos se puede producir una coprecipitación del arsénico en los oxihidróxidos y sulfatos formados (García y col., 2009), o incluso una precipitación como arseniato cálcico, un poco menos insoluble que el fosfato cálcico (Burriel y col., 1999). Quizá por ello algunos suelos muestran

su máximo de retención de As(V) a pH cercano a 10,5 (Goldberg y Glaubig, 1988). En suelos básicos con buena aireación, la solubilidad del As puede estar limitada por su precipitación como arseniatos de Ca o Fe (Xie y Naidu, 2006). En suelos con alto pH los carbonatos pueden jugar un papel importante en la retención de arseniato (Zhang y Selim, 2008). A su vez, cuando el pH baja por debajo de 2,5, el As(V) puede encontrarse completamente protonado (Zhang y Selim, 2008), por lo que es más difícilmente retenido por las partículas del suelo. La Figura 5 resume las cargas que presentan algunos coloides del suelo en función del pH. Todas las zonas sombreadas indican rangos en los que los coloides pueden retener oxianiones de As, a pH ácidos son altamente eficaces los óxidos, mientras a pH básico la retención se puede producir sobre los carbonatos del suelo o los óxidos de aluminio y magnesio (Sadiq, 1997; Cheng y col., 2009).

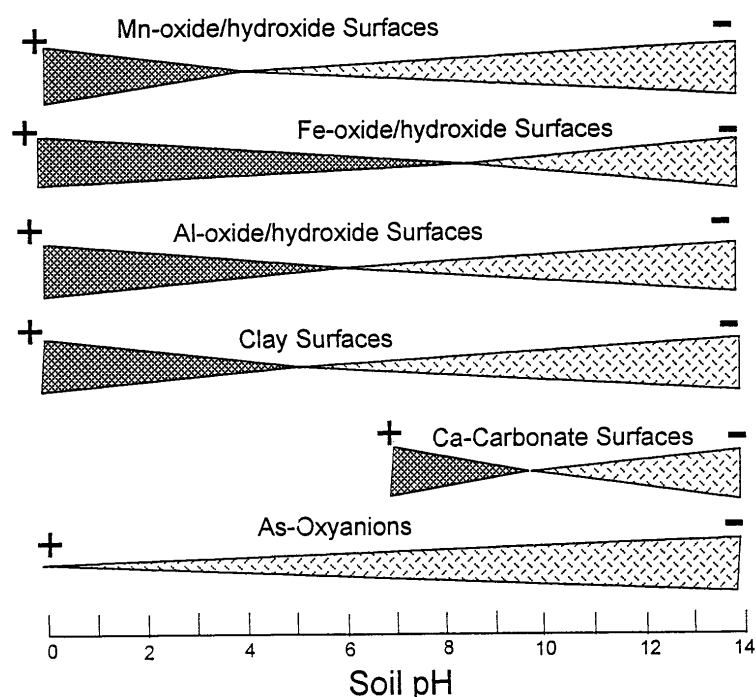


Figura 5. Distribución generalizada de cargas de algunos coloides del suelo (Sadiq, 1997).

Efecto del Eh

La forma predominante de arsénico en medio oxidante es arseniato, que puede retenerse fácilmente en las superficies cargadas positivamente. El As(V) es la forma predominante en suelos con un valor $pH+pe > 10$, mientras el As(III) predomina en aquellos suelos con valores de $pH+pe$ menores de 6 (Sadiq, 1997). Bajo condiciones aeróbicas, los sulfuros se oxidan fácilmente y como consecuencia el arsénico se libera en el medio (Adriano, 2001). En dichas condiciones y con un pH en el intervalo de 3 a 13 las especies mayoritarias serían $H_2AsO_4^-$ y $HAsO_4^{2-}$. En medio reductor, el arsénico se encuentra como arsenito, cuya especie predominante suele ser el H_3AsO_3 . La pobre adsorción del As(III) es debida a su carácter neutro en suelos (Lakshmipathiraj y col. 2006). El arsenito es más móvil y tóxico que el arseniato, lo que va a reflejarse cuando el potencial del suelo es negativo (Fitz y Wenzel, 2002). Por tanto, cambios en

el manejo o en las condiciones de un suelo pueden causar cambios en la especiación del As (Carbonell-Barrachina y col., 2004). En condiciones altamente reductoras puede coprecipitar con sulfuros de hierro como arsenopirita o formando sulfuros de arsénico (AsS , As_2S_3). Durante la oxidación de la pirita el Fe se oxida de II a III, pero también el arsénico se oxida a arseniato. En cambio, bajo condiciones reductoras, los óxidos de Fe y Mn se disuelven, liberando arseniato que rápidamente se reduce a arsenito (Gräfe y Sparks, 2006).

Papel de los óxidos y oxihidroxidos de Fe, Al y Mn

La distribución de los óxidos y oxihidroxidos de Fe, Al y Mn en el suelo depende del pH y el Eh del mismo, aunque por regla general los suelos tienen importantes cantidades de estos óxidos. Bajo condiciones reductoras, la estructura de los hidróxidos de Fe y de los óxidos de Mn se rompe, y el arsénico que estaba fijado en el interior o la superficie de estos compuestos en estas condiciones se libera al medio. Una cuestión bien establecida es que la actividad del arsénico en la solución del suelo va a estar controlada fundamentalmente por las reacciones de retención sobre las superficies de los óxidos y oxihidróxidos de Fe, Mn y Al (Livesey y Huang, 1981; Inskeep y col., 2002; Fitz y Wenzel, 2002; de Brouwere y col., 2004). El As (V) tiene una gran afinidad por las superficies de los óxidos de hierro y forma con éstos complejos de esfera interna, aunque también puede retenerse en complejos de esfera externa (Waychaunas y col., 1993; Cheng y col., 2009). Una representación de la adsorción del As en los óxidos de Fe se muestra en la Figura 6. Existen estudios que muestran que el As (III) puede ser adsorbido y oxidado en la superficie de algunos oxihidróxidos de hierro como por ejemplo la goetita, ferrihidrita y de manganeso como la birmesita (Lin y Puls, 2000). En diversos estudios que analizan la adsorción del arsénico sobre diferentes oxihidróxidos se ha demostrado que la adsorción del As (V) sobre la goetita, magnetita y hematita disminuye cuando aumenta el pH (Grossl y Sparks, 1995; Manning y col., 1997; Matis y col., 1997; Xu y col., 1988; Giménez y col., 2006). Giménez y col. (2006) encontraron que la hematita tenía la mayor capacidad de retención, seguida por la goetita y la magnetita (Bowel, 1994). Los suelos con un contenido alto de Fe extraíble con citrato-ditionito, asociado a la extracción de óxidos de Fe (Mehra y Jackson, 1960), tenían una mayor capacidad de retención de arseniato y arsenito (Manning y Goldberg, 1997). El arseniato presenta una gran afinidad por las superficies de los óxidos de hierro al igual que el fosfato, y sin embargo, el arseniato muestra menos afinidad por los óxidos de aluminio que la que presenta el fosfato (Adriano, 2001). También se ha demostrado que la adsorción del As (III) disminuye con el aumento del pH (Dixit y Hering, 2003), y que el arsenito se retiene en menor medida que el arseniato (Fitz y Wenzel, 2002). En condiciones reductoras, cuando gran parte de los óxidos de Fe y Mn han sido reducidos, la gibsitita (más estable termodinámicamente en condiciones anaerobias) es capaz de absorber parte del As liberado de otros óxidos (Mello y col., 2006). La adsorción de arsénico en óxidos es dependiente del tiempo de interacción As-óxido, siendo más difícil liberar el arsénico cuanto mayor haya sido el tiempo de interacción (Gräfe y Sparks, 2006).

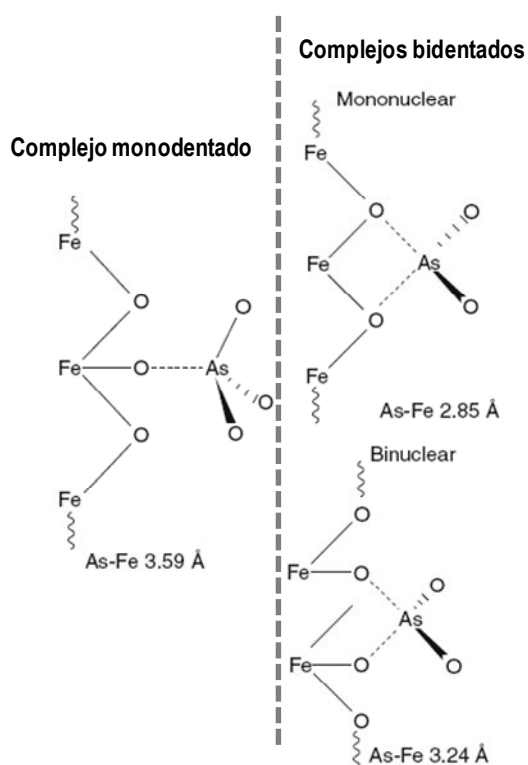


Figura 6. Mecanismos de retención de As en óxidos de Fe (modificado de Zhang y Selim, 2008).

En relación con la capacidad de retención de As en óxidos y oxihidróxidos, se ha comprobado exitosamente en numerosos suelos que añadir Fe en distintas formas al suelo inmoviliza el As. Por ejemplo, se han empleado enmiendas de óxidos de Fe, aplicación de tierras rojas y aplicación de sales inorgánicas de Fe o subproductos industriales ricos en Fe junto con CaCO_3 (Hartley y col., 2004; Hartley y Lepp, 2008; Vithanage y col., 2007). Todo ello consigue aumentar la cantidad de óxidos en un suelo y su capacidad para inmovilizar As.

Concentración de P y otros elementos en el suelo

El anión fosfato, especie mayoritaria de P en suelos (Marschner, 1995), es un análogo del arseniato como vimos en 1.1.1. La aplicación de P al suelo conlleva indiscutiblemente una liberación del As retenido (Fitz y Wenzel, 2002; Cao et al., 2003) por competencia en la retención entre ambos aniones. Dichos iones no solo compiten inespecíficamente en las posiciones de intercambio aniónico, sino que lo hacen también en reacciones de complejación o retención en óxidos (intercambio de ligando, Figura 6). En el caso de las posiciones de cambio, existen otros iones competidores menos eficaces que el fósforo en el desplazamiento del arsénico por las posiciones de cambio. El fosfato y el arseniato se retienen de forma más efectiva que otros aniones en suelo como Cl^- y NO_3^- , que son rápidamente movilizados y lixiviados. Esto podría deberse a que los cloruros y nitratos se adsorben de forma inespecífica sobre la superficie de

los coloides, mientras que fosfatos y arseniatos lo hacen de forma específica. Roy y col. (1986) demostraron que la capacidad de retención de As(V) descendió en presencia de iones fosfato, mientras que la presencia de otros aniones no la afectaron en estudios similares (Livesey y Huang, 1981).

Woolson y col. (1973) demostraron que la aplicación de fertilizantes de fósforo a suelos contaminados por arsénico desplazó el 77% del arsénico total en el suelo, y de esta forma aumentó la disponibilidad de arsénico. Numerosos autores han comprobado que la aplicación de P en suelos provoca un aumento del As extraíble. Sin embargo, este aumento no tiene por qué verse reflejado en la mayor absorción de As por la planta debido a la competencia arseniato-fosfato en su absorción por la planta (Esteban y col., 2003).

Además de con el fosfato, el As presenta interacción con otros aniones. Así, un aumento de la fuerza iónica de la solución del suelo es capaz de disminuir la cantidad de As retenido al provocar una competencia entre aniones por los lugares de retención (Gräfe y Sparks, 2006). Merece la pena destacar que la acción de aniones distintos al fosfato parece ser significativa solamente en ausencia de fosfato, mientras en presencia de fosfato sus efectos serán los predominantes. De este modo, Stachowicz y col. (2008) observaron que los carbonatos podían competir ligeramente con el arseniato por los lugares de retención en ausencia de fosfato, pero cuando el fósforo estaba presente, los efectos de los carbonatos eran insignificantes.

Por otro lado los cationes también puede alterar la retención/movilización de As en los suelos. Smith y col. (2002) obtuvieron que la presencia de Ca^{2+} y Na^{+} provoca un incremento de la retención de As. Del mismo modo, Stachowicz y col. (2008) describen como Ca^{2+} y Mg^{2+} pueden promover de forma similar la la adsorción de fosfato y arseniato en los suelos.

Efecto de los minerales de la arcilla

La disponibilidad del arsénico en general es mayor en los suelos de textura arenosa que en los arcillosos (Adriano 2001). Hay muchos factores que están implicados en los procesos de adsorción y desorción del arsénico, entre ellos la estructura de los minerales primarios y secundarios. Otro de los factores implicados es el tiempo de interacción entre las arcillas del suelo y el arsénico, demostrándose que la absorción de As(V) y As(III) por los minerales de la arcilla aumenta con el tiempo (Lin y Puls, 2000).

La retención de As en las arcillas es menos eficaz que sobre los óxidos (Gräfe y Sparks, 2006), aunque no es desdeñable. El carácter aniónico del arsénico sugiere que el mecanismo de retención de este metaloide en las arcillas podría ser similar al mecanismo de retención de P en suelos mediado por calcio (Fixen y Grove, 1990), mediante la presencia de cationes puente. Estudios como los de Frost y Griffin (1977) muestran que la montmorillonita puede adsorber más As (V) y As (III) que la caolinita, debido a la mayor carga superficial de la montmorillonita. Lin y Puls (2000) encontraron que la halosita y la clorita tienen una mayor capacidad para adsorber As (V) que el resto de los minerales de la arcilla, y también que la caolinita, la illita y la illita/montmorillonita presentan una adsorción moderada de As (V). Zhang y Selim

(2008) sugieren que las sustituciones isomórficas de Fe por Al en las arcillas pueden contribuir a la adsorción de As. La desorción del arsénico desde las arcillas se dificulta debido a que el arsénico inicialmente adsorbido en la superficie de la arcilla con el tiempo puede retenerse cada vez más fuertemente en la estructura del mineral. La adsorción de As(III) en los minerales de la arcilla fue menor. En otro estudio, los suelos californianos que tenían un mayor porcentaje de arcilla y cantidad de óxidos de Fe fueron los que mostraron mayor capacidad de retener As (Manning y Goldberg, 1997). Todo ello pone de manifiesto que aunque la mayor parte de la carga de las arcillas es capaz de intercambiar cationes, éstas son también capaces de retener aniones mediante distintos mecanismos.

Interacción con la materia orgánica

El concepto materia orgánica o humus engloba fundamentalmente una serie de compuestos orgánicos de naturaleza química heterogénea en referencia a su grado de polimerización y peso molecular. En esta fracción del suelo domina el carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y fósforo (por este orden) y los grupos funcionales que predominan generalmente son carboxilos, carbonilos, alcoholes y aminas (Stevenson, 1982). El grado de polimerización de los compuestos del humus y su peso molecular influyen sobre su solubilidad: los más pequeños y con mayor proporción de grupos funcionales serán más solubles (ácidos orgánicos, fúlvicos y húmicos), mientras que los más polimerizados y con poca proporción de grupos funcionales (huminas) serán más estables a lo largo del tiempo e insolubles en agua. Los efectos que va a tener la materia orgánica sobre los elementos traza de un suelo dependen por tanto de su composición cualitativa. Aquella fracción orgánica de alto peso molecular retendrá los elementos traza de forma efectiva, pero la más soluble y ligera puede solubilizar elementos ya sea por quelación (metales) o por desplazamiento (aniones); dependiendo de la que domine en el suelo serán observables unos efectos u otros sobre la fracción disponible del suelo. Por todo ello, el papel de la materia orgánica sobre el arsénico del suelo está todavía en discusión: en algunos estudios la aplicación de materia orgánica ha conseguido disminuir la movilidad del arsénico (Gadepalle y col., 2007), pero en otros se ha observado una liberación de As después de la aplicación de compost o una alta correlación entre carbono soluble y arsénico soluble en suelos (Mench et al., 2003; Clemente y col., 2008). Estos autores observaron también que el carbono soluble puede alterar la dinámica del As al mezclarse el suelo con la enmienda (Beesley y Dickinson, 2010). Weng y col. (2009) han estudiado recientemente como los ácidos fúlvicos y húmicos en disolución son capaces de disminuir la capacidad de retener arseniato de la goetita por competición electrostática. La materia orgánica disuelta puede competir, por tanto, con arseniato y arsenito por los lugares de retención en los suelos (Bernal y col., 2009), aunque por otro lado, otros autores han demostrado que algunos ácidos húmicos forman complejos arcillo-húmicos que tienen capacidad para retener As (Saada y col., 2003). Por tanto la relación entre el arsénico del suelo y la materia orgánica va a ser compleja, dependiente entre otras cosas de la proporción de carbono orgánico soluble, de las fracciones más estables e insolubles del humus y de la cantidad de Fe, Al y Mn de dicha materia orgánica (Gräfe y Sparks, 2006). Un factor a tener en

cuenta cuando añadimos una enmienda orgánica a un suelo es que, aunque su concentración de As pueda llegar sólo a 30 mg kg^{-1} (Adriano, 2001), la cantidad de As biodisponible puede ser alta (Beesley y Dickinson, 2010).

Otros factores

También se ha comprobado que se producen grandes cambios en la disponibilidad de elementos traza y en varios parámetros edáficos a lo largo del año (Vanderlinden y col., 2006). Éstas variaciones son ocasionadas por cambios en las propiedades físicas (humedad, aireación, porosidad, temperatura...), químicas (pH, aparición de precipitados, Eh...) y biológicas (actividad microbiana, estado del ciclo vegetal...) del suelo que dependen de factores ambientales. Dependiendo de la concentración de As, se pueden producir precipitados de sales insolubles como arseniatos de Fe y Ca o coprecipitaciones con jarosita, yeso o calcita (de Brouwere y col., 2004; Zhang y Selim, 2008; Cheng y col., 2009). Estos procesos son frecuentes en zonas mineras con altas concentraciones de As en el suelo. En la Figura 7 se muestran algunos de los minerales de As que pueden encontrarse precipitados en suelos. Otro factor importante en cuanto al riesgo y movilidad del As en los suelos son las épocas de precipitaciones, que obviamente tienen incidencia directa sobre la cantidad de As que se lixivia del suelo en forma de escorrentía superficial y subterránea. El tiempo de interacción del arsénico con el suelo es otro factor importante a tener en cuenta en aquellos suelos contaminados inicialmente por As fácilmente extraíble. Nada más producirse la interacción As-suelo su disponibilidad será mayor que después de un periodo de equilibrado ("aging" en inglés), lo que pone de manifiesto que el paso del tiempo favorece la retención del As en las fracciones menos disponibles en el suelo (Lombi y col., 1999).

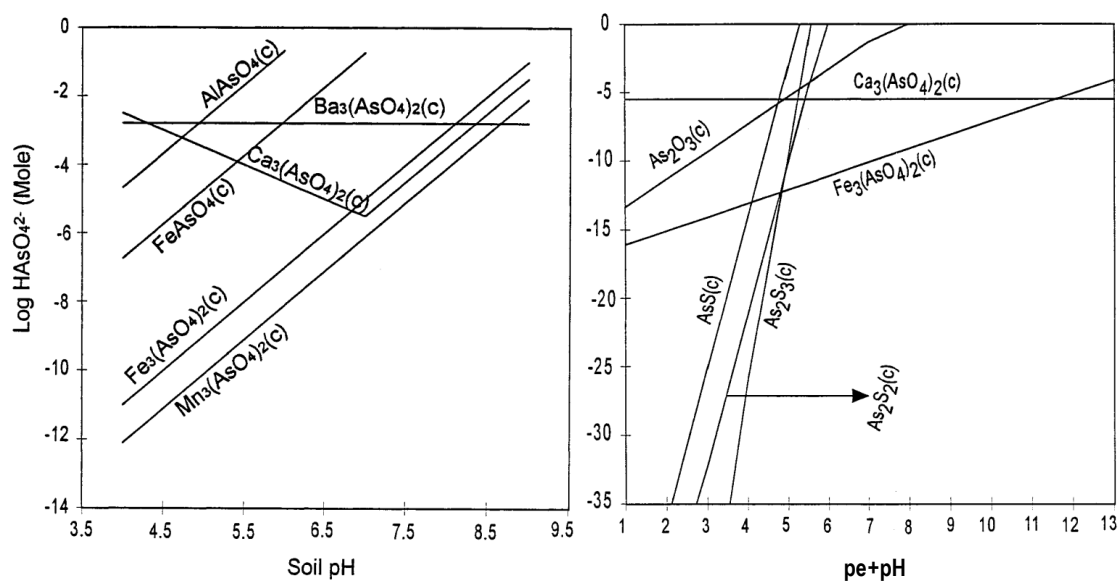


Figura 7. Isothermas de solubilidad de los minerales de arsénico en suelos (modificado de Sadiq, 1997).

1.4 ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE ARSÉNICO EN LAS PLANTAS.

En este apartado se van a describir aquellos mecanismos y procesos que participan en la entrada y acumulación en la planta de elementos en general y de arsénico en particular. Teniendo en cuenta la especiación del arsénico en el suelo, en forma inorgánica predominantemente, su entrada en la planta se va a producir fundamentalmente por absorción vía radicular, de forma análoga a como entran los nutrientes u otros elementos traza. Las raíces de las plantas poseen mecanismos tanto activos como pasivos de entrada de elementos minerales, por lo que su tasa de absorción estará gobernada por mecanismos fisiológicos que son determinantes para la supervivencia de la planta. Sin embargo, los mecanismos de homeostasis son imperfectos y la entrada de elementos en concentraciones tóxicas puede producirse si éstos se encuentran en el suelo en cantidad suficiente. Para mantener la homeostasis de los elementos en rangos que las permitan la supervivencia, las plantas han desarrollado mecanismos de regulación de la absorción de elementos traza, que comprenden mecanismos de distribución/redistribución/almacenamiento/detoxificación cruciales (Verkleij y col., 2009).

Alteración de la movilidad de elementos en el suelo

A nivel radicular, la planta utiliza mecanismos más o menos eficaces para modificar la solubilidad y disponibilidad de los elementos en el suelo (Marschner, 1995). Para ello, modifica las condiciones biogeoquímicas en la zona de influencia directa de la actividad de la raíz o rizosfera (Mengel y Kirkby, 2001). Un ejemplo son los exudados orgánicos, moléculas orgánicas de bajo peso molecular que son capaces de movilizar nutrientes que estén disponibles en suelos en baja cantidad, poniendo a disposición de la planta aniones (fosfatos) y cationes (Fe, Cu,...). Por otro lado, también se han descrito mecanismos vegetales capaces de inmovilizar elementos tóxicos en suelo, como en el caso del aluminio (Mariano y Keljten, 2003). También se sabe que las plantas pueden ser capaces de alterar el pH en la zona de la rizosfera (Marschner, 1995), controlándolo gracias a la exudación de ácidos orgánicos con capacidad tampón. Otro aspecto a tener en cuenta es que prácticamente la mayoría de las plantas establecen relaciones con microorganismos (hongos y bacterias) a nivel radicular que también influyen sobre el ciclo biogeoquímico de la rizosfera. La actividad bacteriana en la rizosfera es especialmente elevada, por tanto las actividades de metilación, reducción u otras producidas por las bacterias pueden estar favorecidas en esta zona (Renella y col., 2007). Poco se sabe todavía acerca de los mecanismos de alteración activa de la disponibilidad de elementos tóxicos en el suelo, pero se sabe que las características de la rizosfera dependen intrínsecamente de la especie vegetal que intervenga.

Aunque la información sobre la capacidad de movilizar/inmovilizar As por las plantas no es abundante (Fitz y Wenzel, 2002), la analogía fosfato/arseniato permite establecer ciertos paralelismos en la dinámica del P y del As en la rizosfera. En muchas especies vegetales existe un mecanismo activo de

movilización de P mediante el bombeo de exudados radiculares a la rizosfera (Smith y Read, 1997). Estos exudados suelen ser compuestos orgánicos de bajo peso molecular (ácidos carboxílicos como cítrico y málico) que son capaces de desplazar fosfato de los lugares de retención en el suelo, quelar metales que estén inmovilizando el P en el suelo o incluso formar complejos metal-quelato con el P (Kirk y col., 1999). La movilización de P inducida por los ácidos orgánicos excretados ha sido atribuida también a cambios en el pH en la zona de influencia de la raíz, lo que puede alterar la geoquímica de los elementos en la rizosfera (Raghothama, 1999). La excreción de flavonoides también está implicada en la solubilización de P del suelo y su absorción por la planta (Tomasi y col., 2008). Por analogía, cabe esperar que todos estos procesos sean capaces también de movilizar As y se ha comprobado, por ejemplo, que los ácidos orgánicos son capaces de desplazar arseniato de las posiciones de intercambio (Redman y col., 2002; Wenzel, 2009). Por otro lado, el arsénico en suelos está retenido en gran proporción en óxidos-hidróxidos. Cualquier estrategia capaz de atacar los óxidos-hidróxidos de Fe para movilizar el Fe de los suelos alterará por tanto las superficies de retención del As, pudiendo incluso solubilizarlo (Fitz y Wenzel, 2002).

Las micorrizas son asociaciones entre las raíces vegetales y hongos, donde el hongo puede colonizar la raíz extra o intracelularmente, dependiendo del tipo de micorriza formada, y tienen un papel fundamental en la nutrición mineral de la planta y la absorción de elementos (Marschner, 1995; Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Fitz y Wenzel, 2002). La micorrización se produce en el 80% de las angiospermas y el total de las gimnospermas (Fitz y Wenzel, 2006) y confiere a la planta en muchas ocasiones resistencia a estreses bióticos y abióticos (Latch, 1993; Schützendubel y Polle, 2002). Especialmente importante es el caso del fósforo: muchas micorrizas tienen un papel fundamental en la nutrición fosfórica en la planta (Mengel y Kirkby, 2001), aumentando en 2-3 veces la acumulación de P en planta (Fitz y Wenzel, 2006). Por este motivo, el estudio de micorrizas adquiere relevancia cuando hablamos de la interacción As/P en la planta. La absorción de As disminuyó en presencia de micorrizas en plantas de *Pteris vittata*, lenteja, alfalfa, tomate, girasol y maíz (Trotta y col., 2006; Ahmed y col., 2006; Chen y col., 2007; Liu y col., 2005; Ultra y col., 2007a; Yu y col., 2009). En el caso del maíz, las micorrizas solo eran capaces de disminuir significativamente la absorción radicular de arseniato, pero no la de arsenito (Yu y col., 2009). En este mismo caso también fue descrita una disminución de la actividad arseniato reductasa en raíz debida a la infección. Algunos autores atribuyen la menor concentración de As en plantas micorrizadas al bloqueo de su absorción (Yu y col., 2009), mientras otros lo atribuyen a un efecto dilución por el aumento de peso inducido en la planta (Chen y col., 2007).

Absorción de arsénico

La absorción radicular es la vía mayoritaria de entrada a la planta de muchos elementos y es necesario que el elemento en cuestión se encuentre disuelto para ser absorbido por la planta (Mengel y Kirkby, 2001). La Figura 8 detalla una estructura simplificada del corte de una raíz vegetal tipo.

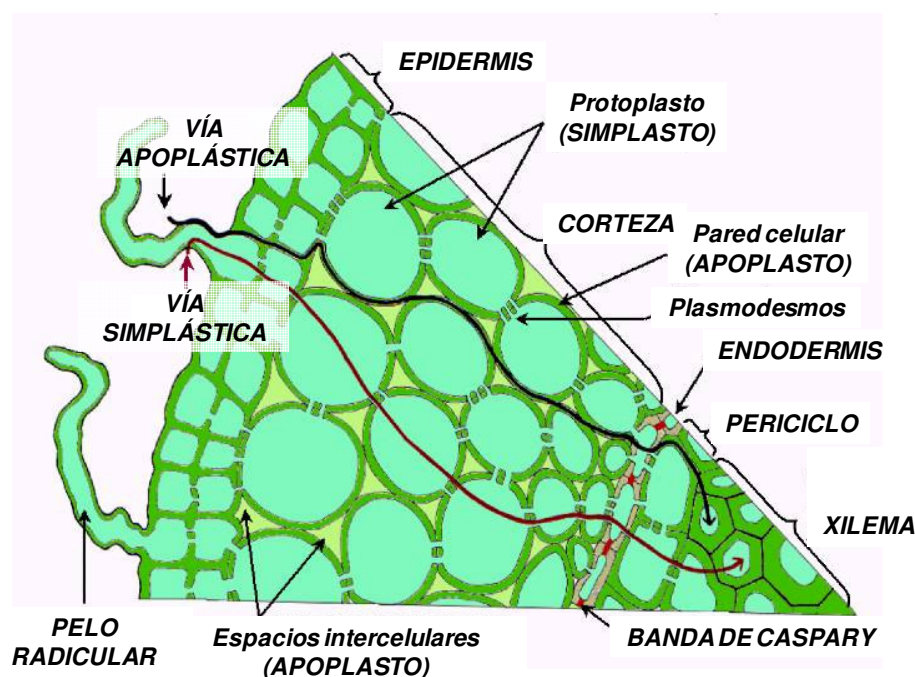


Figura 8. Estructura de la raíz vegetal. Las distintas vías de transporte se detallan en negro y rojo. Modificada de: <http://www.euita.upv.es/>.

Los iones solubilizados en la zona de la raíz entran en ella gracias al movimiento del flujo del agua o por difusión entre la solución que hay dentro del apoplasto de la raíz y la circundante. La solución del suelo y los iones disueltos pueden entrar directamente vía simplástica (entrada dentro de las células) o apoplástica, en un flujo desde la epidermis hasta la Banda de Caspari a través del espacio libre intercelular. La Banda de Caspari obliga a los elementos químicos a continuar el camino por la vía simplástica, es decir, a penetrar en el interior de las células vegetales. A nivel de la membrana celular la entrada de los iones (absorción) se produce de forma general mediante proteínas transportadoras. El paso de los iones se puede producir por transporte pasivo (difusión facilitada a favor de gradiente) o activo (en contra de gradiente con gasto de energía). Aunque hay distintos tipos de transportadores de membrana, en el caso del arsénico hay dos que tienen un papel fundamental en su absorción: las acuaporinas y los transportadores de fosfato.

Las acuaporinas son canales de entrada de agua por los que pueden entrar otras moléculas no cargadas, como el ácido arsenioso. Varios autores han comprobado la implicación de las acuaporinas en la absorción de arsenito (Isayenkov y Maathuis, 2008; Ma et al., 2008; Meharg y Jardine, 2003). Experimentalmente se ha comprobado también que el arsenito comparte vías de entrada y transporte con el Si en plantas de arroz (Ma y col., 2006), debido a que existe un grupo de acuaporinas (NIPs) que juegan un papel fundamental en la absorción de moléculas sin carga como glicerol, amoníaco y ácido bórico, silícico y arsenioso (Zhao y col., 2009).

Mientras, los transportadores de fosfato (de los que hay distintos tipos con distinta afinidad) pueden permitir la entrada de arseniato en muchas especies vegetales. Estudios fisiológicos han demostrado el papel principal de estos canales fosfato para la absorción de arseniato por las raíces vegetales (Meharg y Mcnair, 1992; Esteban y col., 2003). El mecanismo de absorción de fosfato/arsenato implica un cotransporte del anión y protones, con una estequiometría de 2 H⁺ por cada anión (Zhao y col., 2009). Hasta el momento no se ha descrito ningún transportador específico para la absorción de arsénico. La Figura 9 resume los procesos que ocurren en el sistema suelo-planta del arseniato, poniendo de manifiesto lo compleja que es su dinámica.

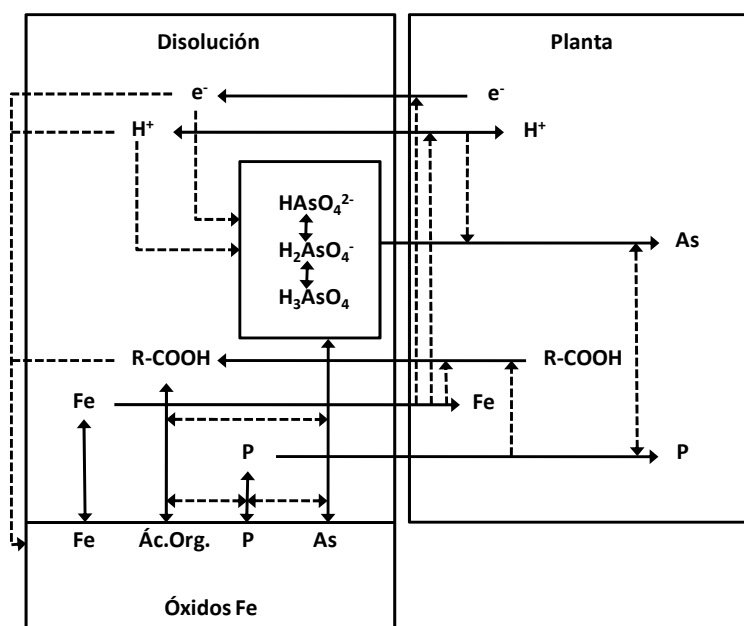


Figura 9. Modelo conceptual del arseniato en el sistema suelo-planta (modificado de Fitz y Wenzel, 2002). Los flujos y transformaciones se muestran en línea continua, las influencias e interacciones en discontinua.

La absorción de moléculas orgánicas de As (las cuales son poco frecuentes en suelos) es menos efectiva que la de As inorgánico (Marín y col., 1992; Raab y col., 2007; Zhao y col., 2009).

Acumulación y transporte

Una vez en el interior de la célula, el arseniato es reducido a arsenito gastando glutatión reducido: $\text{AsO}_4^{3-} + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{AsO}_3^{3-} + \text{GSSG}$, catalizado por la actuación de arseniato reductasas (Verbruggen y col., 2009). Así se ha comprobado que la mayoría del arsénico en tejidos vegetales está presente en la forma de arsenito (Tripanthi y col., 2007), independientemente de lo que hubiese en la solución de cultivo. Esta forma tiene una alta afinidad por los grupos -SH y suele ser complejada y almacenada en la vacuola, pero también puede transportarse vía xilema a otros tejidos vegetales. El movimiento xilemático está gobernado por el flujo de agua creado por la corriente de transpiración, pero también está mediado por proteínas

transportadoras de membranas. Recientemente se ha descrito un transportador localizado entre la exodermis y endodermis vegetal (Lsi2), inicialmente implicado en la nutrición de Si, que permite la entrada de arsenito hacia el xilema (Ma y col., 2008). El transporte de As en la mayoría de especies vegetales no es generalmente muy efectivo y suele permanecer en las raíces, excepto en aquellas plantas con una capacidad excepcional de acumular As en parte aérea. La acumulación de arsenito en vacuola puede influir en la baja tasa de llegada del As al xilema (Zhao y col., 2009), lo que puede proteger a zonas sensibles de la parte aérea de la llegada del elemento tóxico. El transporte xilemático de As tiene gran importancia porque va a determinar la distribución y localización del metaloide en la planta. Dicho transporte ha sido estudiado intensamente en los últimos años con resultados interesantes, aunque contradictorios en algunos aspectos. La reducción de As(V) a (III) en la raíz parece un proceso clave para bloquear el transporte de As en muchas especies vegetales. El fosfato es un anión altamente móvil en planta, por lo que cabría esperar por analogía que el arseniato lo sea también. Dicha hipótesis fue comprobada en plantas mutantes de *A. thaliana* cuya arseniato reductasa había sido silenciada, que tuvieron un ratio $[As]_{\text{Parte Aérea}}:[As]_{\text{Raíz}}$ 25 veces mayor que las plantas silvestres (Dhankher y col., 2006). Dichos autores sugirieron que el aumento de dicha relación se debía a la mayor proporción de As(V) en la raíz disponible para el transporte vía xilema, presumiblemente a través de las vías del fosfato. La mayoría del As en plantas no acumuladoras se encuentra en forma de As(III) (Pickering y col., 2000; Dhankher y col., 2002; Xu y col., 2007), por lo que dicha reducción a nivel radicular podría estar relacionada con algún mecanismo fisiológico en las plantas que limite el flujo del As en el xilema y proteja la parte aérea del metaloide. Adicionalmente, la mayoría del As en raíz se encuentra en forma complejada en plantas (Vázquez y col., 2005), y se ha observado una correlación negativa entre el porcentaje de As complejado por grupos -SH en la raíz y la translocación del As hacia la parte aérea (Huang y col., 2008). A este respecto, Raab y col. (2005) postulan que el As complejado no es transportado por la vía xilemática. Este fenómeno se describirá más detalladamente en el apartado 1.6. del documento. En cuanto a las plantas hiperacumuladoras de As, algunos autores han encontrado pruebas directas usando preferentemente sincrón y usando cromatografía líquida acoplada a ICP como técnicas de estudio de que el As es transportado de la raíz a la parte aérea como As(V) y luego se almacena en las frondes como As(III) (Zhao y col., 2003; Pickering y col., 2006; Hokura y col., 2006; Tripathi y col., 2007). Sin embargo, Duan y col. (2005) encontraron la mayor actividad arseniato reductasa en las raíces de *P. vittata*, hipotetizando que el transporte xilemático en el helecho debería producirse mayoritariamente como arsenito. En cualquier caso, tanto en plantas no acumuladoras como acumuladoras parece que el As se almacena en la vacuola vegetal una vez dentro del citoplasma celular, para impedir su interferencia en el normal funcionamiento celular (Verbruggen y col., 2009). Aunque para As no se ha descrito ningún mecanismo similar hasta la fecha, cabe destacar que para otros elementos traza se ha descrito como hay tejidos menos activos metabólicamente que son susceptibles de almacenar el elemento tóxico de forma menos dañina para la planta, como son tejidos epidérmicos (Vázquez y col., 1992) o senescentes (Ernst y col., 2000).

Existe una clasificación realizada en función de la concentración de elemento traza que se encuentra en la parte aérea de las plantas (Baker, 1981):

- a) Plantas exclusoras: aquellas que restringen la llegada del elemento en cuestión a la parte aérea, por lo que su concentración es baja. Cuando la concentración de tóxico en el medio es demasiado alta, la planta no puede excluirlo y se refleja una subida repentina de su concentración, lo que suele causar efectos drásticos sobre la planta.
- b) Plantas indicadoras: la concentración de elemento en parte aérea es proporcional a la que hay en el suelo.
- c) Plantas acumuladoras: aquellas que muestran una concentración elevada de elemento traza en la parte aérea, mayor que la del suelo en que viven.

Especialmente llamativo es el caso de las especies hiperacumuladoras. Se han establecido varios criterios para definir la hiperacumulación de un elemento, pero básicamente tienen en común la concentración inusualmente alta en parte aérea de elementos traza (Lasat, 2002). Las características más comunes para declarar una planta como hiperacumuladora serían: i) que la concentración de elemento en parte aérea sea alta, en el caso del As $> 0,1\%$, ii) que la concentración en parte aérea sea 10-500 veces mayor que la de la misma planta en ambientes no contaminados, y iii) que el ratio de las concentraciones del elemento en parte aérea y raíz sea > 1 (Branquinho y col., 2006). Recientemente se ha lanzado la hipótesis de que la acumulación de elementos traza en parte aérea podría ser un mecanismo de defensa frente a sus enemigos, especialmente herbívoros, ya que dichas plantas serían menos atractivas para su consumidor o incluso causarían su muerte (Poschenrieder y col., 2006; Boyd, 2007).

Entre las especies hiperacumuladoras de As descritas estarían *Pteris vittata* (hasta 22000 mg As kg^{-1}), *Jasione montana* (6640), *Calluna vulgaris* (4130), *Agrostis tenuis* y *stolonifera* (10000), *Pityrogramma calomelanos*, *Mimosa púdica*, *Melastoma malabathricum* (8350) (Wang y Mulligan, 2006). Exceptuando el caso particular de dichas hiperacumuladoras, la mayoría de las plantas acumulan el arsénico en raíz. Eso no exceptúa el hecho de que muchas plantas están adaptadas a vivir en suelos con concentraciones altas de arsénico, englobadas en el grupo de ecotipos excluidores tolerantes (Figura 10). Se verá más adelante cómo una estrategia eficaz de detoxificación de elementos traza en las plantas es inactivarlos en la raíz. Las concentraciones de arsénico en parte aérea excepcionalmente superan 2 mg As g^{-1} (Horswell y Speir, 2006). Desde el punto de vista agrícola, existe un problema en las zonas que son inundadas con aguas cargadas con As ya que los cultivos pueden contener cantidades del metaloide que los hacen peligrosos para la alimentación (Bhattacharya y col., 2007).

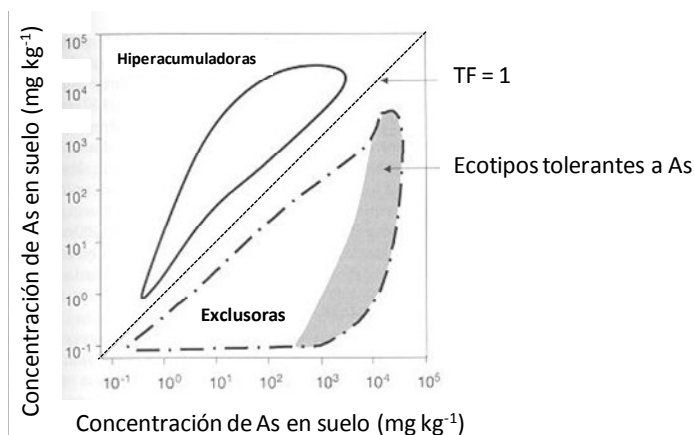


Figura 10. Patrón generalizado de las estrategias de absorción de As por las plantas terrestres (modificado de Fitz y Wenzel, 2006). TF= factor de transferencia ($[As]_{\text{Parte Aérea}} / [As]_{\text{Suelo}}$), cuando es cercano a 1 las plantas serán indicadoras.

1.5 TOXICIDAD

La presencia de arsénico dentro de las células vegetales tiene efectos fisiológicos negativos para la planta que originan una serie de respuestas (síntomas de toxicidad) que han sido objeto de numerosos estudios recientes. Por regla general, los efectos negativos de un elemento se reflejan cuando su concentración sobrepasa un determinado umbral o nivel tóxico. Existen numerosos parámetros que permiten estudiar la toxicidad de un elemento para un organismo vivo o para algún proceso fisiológico:

- NOEC: concentración que no provoca efectos observables. El PNEC es la concentración prevista que no produce efectos.
- EC_{50} : concentración de un tóxico que produce el 50% del efecto máximo.

Dependiendo si estamos hablando de elementos con función biológica o sin ella, la concentración de elementos en suelo muestra un efecto sobre el rendimiento vegetal típico (Verkleij y col., 2009), que se muestra en la Figura 11. En el caso del arsénico, la función biológica en las plantas se desconoce, aunque si se han descrito efectos positivos a bajas dosis de arseniato. La causa de estos efectos positivos no ha sido aún establecida, por un lado podría atribuirse al propio As, pero muchos autores lo han atribuido a un incremento un aumento en la absorción de P por la planta asociado a las bajas dosis de As (Carbonell-Barrachina y col., 1998). El arsenito es por lo general más tóxico que el arseniato, debido parcialmente a su mayor solubilidad y movilidad (Scott-Fordsmand y Pederson, 1995).

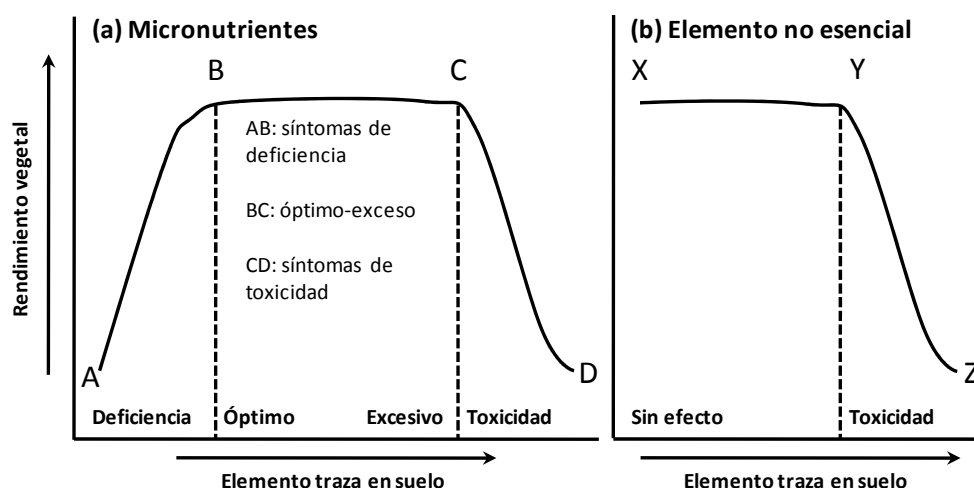


Figura 11. Curvas típicas de dosis-respuesta para micronutrientes (a) y para elementos traza no esenciales (b); B: concentración crítica baja, C-Y: concentración crítica alta (modificado de Clemente y col., 2004).

La toxicidad de compuestos organoarsenicales no ha sido aún muy estudiada, aunque parecen interferir en los tejidos meristemáticos de la parte aérea y en la síntesis de proteínas (Horswell y Speir, 2006).

Los mecanismos inducidos por As y los efectos causantes de la fitotoxicidad de As son hasta la fecha desconocidos en muchos aspectos, aunque en los últimos años han sido estudiados e identificados algunos de ellos (Verbruggen y col., 2009). Para estudiar la toxicidad de elementos traza sobre plantas suelen utilizarse plantas cultivadas y/o herbáceas, sin embargo existe aún un déficit de conocimiento sobre los efectos en especies leñosas que frecuentemente se utilizan en revegetación de suelos degradados (Fuentes y col., 2007), las cuales pueden jugar un importante papel en la rehabilitación de suelos contaminados (Lepp y Dickinson, 1998).

Efectos visuales

La reducción del crecimiento es uno de los síntomas visuales que se atribuyen al arsénico. Tanto arseniato como arsenito provocaron la reducción del crecimiento en especies vegetales cultivadas en hidroponía como *Holcus lanatus*, *Lupinus albus* o *Triticum aestivum* (Hartley-Whitaker y col., 2001; Vázquez y col., 2005; Geng y col., 2006). En el caso del arseniato algunos autores han relacionado esta reducción con la disminución de la concentración de P provocada por altas dosis de As. Los síntomas que provoca el arseniato son la reducción de la elongación radicular (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002), la falta de ramificación radicular (Figura 12), clorosis en las hojas (Machner y col., 2002; Moreno-Jiménez y col., 2008), marchitamiento foliar, o el achaparramiento e incluso la necrosis en la parte aérea (Carbonell y col., 1998). Los daños producidos en la raíz y las hojas dificultan el flujo normal de agua en la planta.

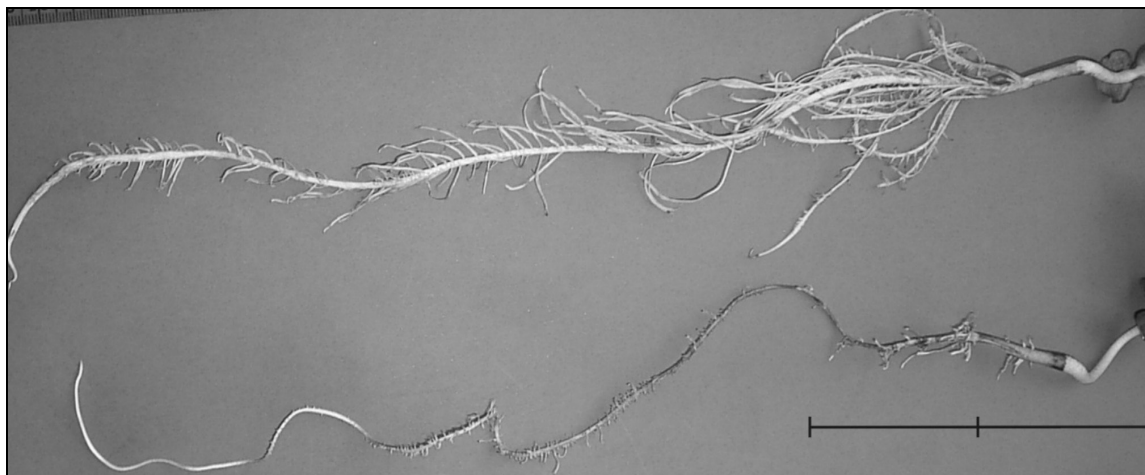
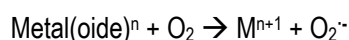


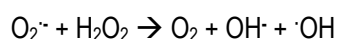
Figura 12. Aspecto visual de raíces de *Lupinus albus* después de 4 semanas de cultivo con 0 As (arriba) o 13,3 μM As (abajo) en ausencia de P (barra = 10 cm). Moreno-Jiménez y col., datos sin publicar. La longitud de las raíces fue similar, pero no lo fue el peso.

Estrés oxidativo

Los elementos con actividad redox son buenos catalizadores de la reacción de reducción del oxígeno. Entre ellos hay varios metales (Cu, Hg...) y metaloides (As):



En una disolución acuosa de pH cercano a la neutralidad, como es el citoplasma, el radical puede generar agua oxigenada, que a su vez puede generar radicales hidroxilo siguiendo la ecuación de Haber-Weiss:



Todas estas especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden dañar directamente biomoléculas como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos o causar la peroxidación de lípidos de membrana.

El arsénico produce estrés oxidativo en las células vegetales, lo que ha sido observado por numerosos autores y reflejado en un aumento de la concentración de malondialdehído (MDA) en tejidos vegetales, un metabolito producto de la peroxidación de lípidos de membranas biológicas.

Alteraciones nutricionales

La nutrición mineral vegetal se ve afectada de forma inespecífica por muchos elementos tóxicos mediante la alteración de los procesos de transporte a través de la membrana celular, además de por los efectos sobre la transpiración vegetal. El efecto más destacable producido por el As es aquel derivado de las similitudes que tienen los aniones arseniato y fosfato. El suministro de arseniato provoca un descenso de los niveles de P en las plantas, debido a que ambos iones entran por el mismo transportador de membrana

(Meharg y McNair, 1992; Vázquez y col., 2005). Adicionalmente se han detectado otras alteraciones nutricionales derivadas de la presencia de As en el medio en que vivían las plantas como descenso de Mn, Cu, N, Zn y Mg (Mascher y col., 2002; Vázquez y col., 2008b).

Inhibición de la fotosíntesis

Como ya se ha dicho, el arsénico provoca clorosis en las hojas. El suministro de arsénico causó la disminución de los niveles de clorofilas (Mascher y col., 2002). Aunque hay muchos motivos para esta clorosis (como deficiencia de Fe), en el caso del arsénico se atribuye directamente a la inhibición de la síntesis del pigmento (Jain y Gadre, 1997). En dicho estudio, las causas de dicha inhibición son una limitada disponibilidad del ácido δ -aminolevulínico (que es un precursor de la clorofila) y las alteraciones producidas sobre las proteínas ricas en grupos tioles.

Alteración del metabolismo y alteraciones genéticas

Teóricamente el arseniato puede sustituir al fosfato en metabolitos y procesos metabólicos. Así, dentro del citoplasma el arseniato compite con el fosfato por en las reacciones de fosforilación, por ejemplo en la síntesis de ATP, pudiendo formar ADP-As altamente inestable que altera el ciclo energético celular (Scott-Fordsmand y Pederson, 1995; Verbruggen y col., 2009). El arsenito tiene una alta afinidad por los grupos -SH de las biomoléculas (enzimas y proteínas), puede unirse fácilmente a ellos e inhibir su función (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). Tanto As(III) como As(V) son mutagénicos y pueden dañar el genoma (Lin y col., 2008). Se ha sugerido que la presencia de biomoléculas reparadoras de la cromatina son capaces de aumentar la tolerancia de las plantas a As (Verbruggen y col., 2009).

1.6 RESISTENCIA.

La resistencia de las plantas a los elementos tóxicos se define como la capacidad general de soportar un exceso de elementos tóxicos presentes en el medio (Levitt, 1980). El concepto tolerancia (aunque muchas veces se utiliza también para describir resistencia) sería la capacidad de sobrevivir de una planta en un suelo que es tóxico para otras plantas, y que se manifiesta por la interacción genotipo-ambiente (Hall, 2002). Ersnt y col. (2008) han establecido otra clasificación basada en la tolerancia/sensibilidad de una planta a los elementos traza: (i) plantas hipotolerantes, sensibles o hipersensibles son aquellos fenotipos modificados genéticamente que son extremadamente vulnerables a uno o varios metales/-oides; (ii) tolerante basal sería el equivalente a resistencia, es decir, la resistencia genética de una especie (suelen denominárseles también poblaciones no metálicas o con tolerancia constitutiva); (iii) hipertolerantes son aquellas poblaciones con una baja sensibilidad a uno o varios elementos debido a mecanismos adaptativos (denominadas también poblaciones metalófilas y adaptadas). Todo ello pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos que regulan las estrategias de las plantas para combatir la toxicidad de los elementos traza. En el caso del arsénico, las plantas controlan sus efectos tóxicos utilizando varias estrategias que implican numerosos mecanismos biológicos, todos ellos se conocen con el nombre de mecanismos de detoxificación. Hasta la fecha no se conocen suficientemente los mecanismos celulares que permiten detectar la presencia de As ni las señales que se inducen después de su detección para poner en marcha los mecanismos de detoxificación, además de aquellas señales celulares que indican los daños producidos (Verbruggen y col., 2009).

Micorrización

Aunque ya se comentó anteriormente conviene recordar que la microbiología de la raíz es capaz tanto de alterar la absorción de As y su distribución en la planta como de controlar la absorción de nutrientes. Pero las micorrizas también pueden modificar los patrones de tolerancia en la planta huésped (Sharples y col., 2000; González-Chávez y col., 2002; Leung y col., 2006). Respecto al efecto que producen las micorrizas sobre el huésped, las plantas pueden ser clasificadas en: (i) plantas que responden positivamente a la micorrización, con incrementos de biomasa y mejoras en la nutrición mineral (plantas AM-r), y (ii) plantas sobre las que la micorrización tiene efectos neutros o negativos (plantas n-AM-r). Smith y col. (2010) han revisado como la micorrización aliviaba eficazmente los efectos tóxicos del As en aquellas plantas AM-r, mientras que los efectos sobre las plantas n-AM-r son variables en la literatura. Por ejemplo, las plantas micorrizadas de centeno salvaje no mostraron mayor tolerancia al As (Knudson y col., 2003). En los casos en los que la tolerancia aumentó en las plantas micorrizadas, el incremento se ha explicado por diversos motivos. Por ejemplo, Xu y col. (2009) atribuyen los efectos positivos a la mayor absorción de P y menor concentración de As en las plantas de *Medicago truncatula*, mientras que Yu y col. (2009) los

explicaron por el bloqueo en la absorción de As y las alteraciones en su especiación en plantas de maíz micorrizadas.

Inmovilización en la rizosfera

Se ha comprobado principalmente en suelos encharcados que en las cercanías de la raíz se produce la formación de placas de hierro. Estas placas son capaces de retener altas concentraciones de As, actuando como primer filtro a nivel radicular. Este mecanismo es particularmente eficiente en zonas como arrozales o zonas de plantas acuáticas, donde ha sido muy estudiado (Hansel y col., 2002; Liu y col., 2004, 2006). En la rizosfera de suelos aireados se producen procesos redox (Kidd y col., 2009; Zhao y col., 2009) que pueden favorecer también la formación de una placa de Fe que retenga As en las cercanías de las raíces. De modo similar podría actuar el Fe que se retiene en la zona apoplástica de las raíces de plantas crecidas sobre suelos bien aireados (Douceff y Terry 2002; Vázquez y col., 2007), aunque este mecanismo ha sido estudiado de forma aún incompleta.

Exclusión

La primera barrera que se ha demostrado eficaz para impedir los efectos del As en la planta, consiste en reducir la entrada de As a través de los mecanismos de absorción radicular. En este sentido, se ha comprobado que plantas de *Holcus lanatus* de poblaciones tolerantes carecen de los sistemas de absorción de alta afinidad de fosfato (Meharg y Macnair, 1990, 1992). Por ello mostraron una menor tasa de absorción de ambos, fosfato y arseniato, consiguiendo así una mejor adaptación a medios con altos niveles de As (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). En *Arabidopsis thaliana*, la presencia de As(V) reprimió los genes implicados en la absorción de fosfato, pero a su vez indujo otros genes transcripcionales inducidos por As, sugiriendo que las distintas vías transcripcionales que regulan la deficiencia de Pi y las respuestas a As están comunicadas (Catarcha y col., 2007)

Salida activa de As (efflux)

El arseniato que entra en las células puede ser parcialmente expulsado (Xu y col., 2007) de modo similar a lo que sucede con el fosfato a altas concentraciones (Mimura, 1999). Sin embargo, conviene recordar que una vez ha entrado en la planta, el arseniato se reduce rápida y mayoritariamente a arsenito. Por tanto, independientemente de la forma de entrada, una vez en las células de la raíz el As(III) es mayoritario (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). Aunque este mecanismo no ha sido completamente establecido, Zhao y col. (2009) en una reciente revisión han recopilado la información existente acerca de

este tema. La salida activa de arsenito se ha observado en varias especies vegetales crecidas en hidroponía: trigo, cebada, maíz, tomate, *H. lanatus* o *Arabidopsis thaliana*. Las evidencias fisiológicas indican que la salida es activa y dependiente de un gradiente de protones del metabolismo celular. Todavía no se ha demostrado una relación directa entre un mayor flujo de salida y mayor tolerancia de una población vegetal, pero en microorganismos sí (Bhattacharjee y Rosen, 2007). En estudios en suelo existen también evidencias de una acumulación de arsenito en las cercanías de la raíz de girasol y maíz (Ultra y col., 2007a-b; Vetterlein y col., 2007). Se estima que pueda llegar a expulsarse el 50-80% del As absorbido por las raíces mediante este mecanismo en plantas no acumuladoras (Verbruggen y col., 2009). Por otro lado, sí se ha demostrado que los hiperacumuladores no expulsan As al medio externo por la raíz (Zhao y col., 2009).

Complejación

Las plantas aprovechan la alta afinidad del arsenito por los grupos –SH para inactivar los efectos tóxicos del As. Para ello existen ligandos en el citosol por los que los elementos traza tienen alta afinidad. Se ha comprobado la complejación de As(III) por distintas biomoléculas ricas en grupos tiólicos como glutatión o fitoquelatinas en distintas especies vegetales (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). Por ejemplo, se ha comprobado como la presencia de algunos elementos traza como Ag, As, Cd, Cu, Hg, Se o Pb en plantas induce la síntesis de fitoquelatinas. Las fitoquelatinas (PCs) son pequeños péptidos ricos en cisteína de estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ donde $n=2-11$ que se unen a los elementos traza mediante enlaces tiolato y que se sintetizan a partir de glutatión (GSH) mediante la enzima PCsintasa. Las PCs pueden complejar de forma efectiva el arsénico inorgánico que se acumula en las plantas pero también se han identificado complejos $\text{GS}_3\text{-As(III)}$ en plantas (Delnomdedieu y col., 1994; Pickering y col., 2000). En muchas especies se ha observado una respuesta vegetal ante la presencia de As en el medio, como son los casos de altramuza, *Holcus lanatus*, girasol o *Silene vulgaris* (Hartley-Whitaker y col., 2001; Vázquez y col., 2005; Raab y col., 2005; Sneller y col., 2000). De hecho plantas de *Arabidopsis* con mayor capacidad de síntesis de PCs eran más tolerantes que las silvestres (Dhankler y col., 2002) y los clones más resistentes de *H. lanatus* fueron los que mostraron una mayor respuesta en el contenido de PCs (Hartley-Whitaker y col., 2001), indicando todo ello un papel de las PCs y, probablemente, del GSH en la detoxificación de As. Sin embargo cabe destacar que este mecanismo requiere un importante esfuerzo metabólico y en ocasiones la tolerancia no se ha relacionado con niveles más altos de fitoquelatinas o tioles, como es el caso de los hiperacumuladores, donde este mecanismo de detoxificación parece limitado en comparación con las altas concentraciones de As que acumulan (Zhao y col., 2003). Algunos datos sugieren que el grado de complejación SH-As en raíz está correlacionado negativamente con la translocación de As a la parte aérea (Huang y col., 2008).

Compartimentación vacuolar

Probablemente, una vez que el arsenito se ha complejado, la mayor parte del As quedaría almacenado en las vacuolas de las raíces, lo que lo inactivaría e impediría su movilidad en el citoplasma celular y su translocación a través del xilema. Sin embargo se postula la importancia de la compartimentación vacuolar en la detoxificación de As en todos los órganos de la planta (Pickering y col., 2006). Una vez en la vacuola, el pH en torno a 8 podría provocar la ruptura del complejo, pudiéndose utilizar el ligando para complejar más arsenito. No hay ningún dato experimental acerca de la entrada *in vivo* de PC-As o GSH-As a través del tonoplasto (Tripanthi y col., 2007), pero si se ha comprobado *in vitro* (Dhanker y col., 2006). Dicha entrada a vacuola del arsenito complejado por grupos tiólicos se producirá probablemente mediante transportadores del tipo ABC (Verbruggen y col., 2009).

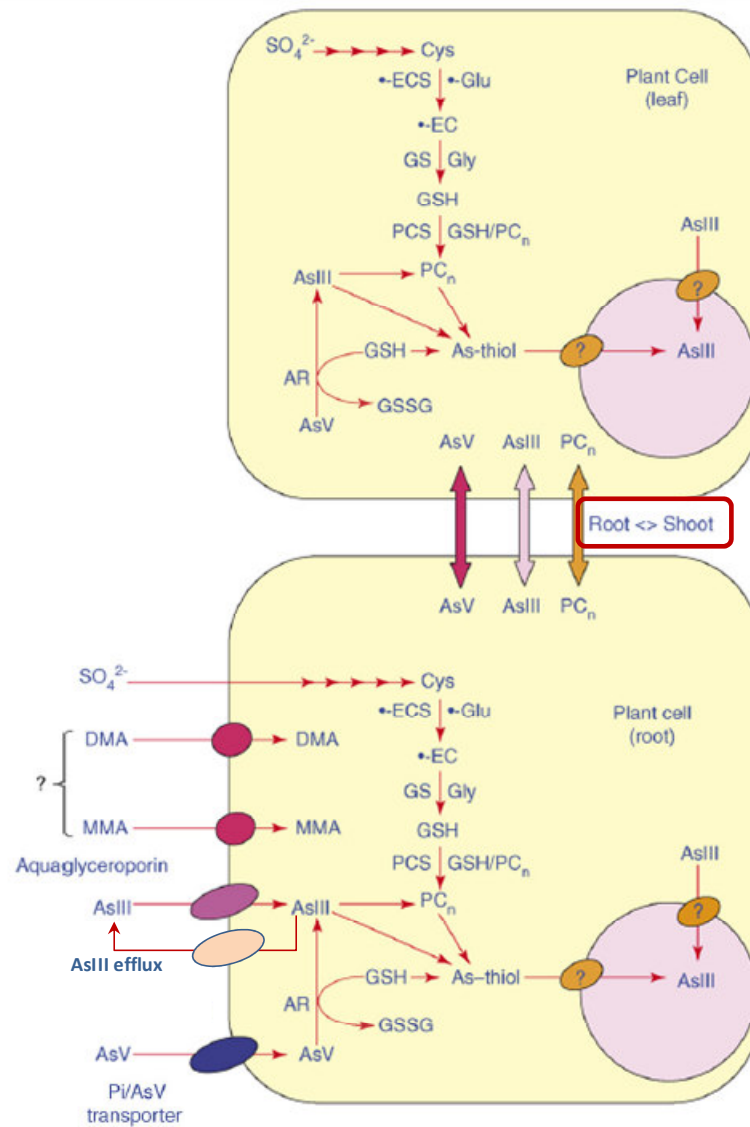


Figura 13. Esquema sobre los mecanismos de absorción, translocación y detoxificación de arsénico en plantas (modificado de Tripanthi y col., 2007). Las plantas toman el arseniato y arsenito a través de los transportadores de fosfato o acuagliceroporinas respectivamente. Las plantas pueden absorber pequeñas proporciones de As orgánico, pero no se conoce a través de qué transportadores. El arseniato se reduce mayoritariamente en la raíz mediante la acción de arseniato reductasas y la presencia de GSH reducido. El arsenito radicular puede ser bombeado hacia el exterior. Solo una pequeña parte del arsénico absorbido es transportado vía xilema en la mayoría de las especies vegetales, aunque los hiperacumuladores consiguen translocar efectivamente el As. El arsénico es complejoado en planta por compuestos ricos en azufre como glutatión y fitoquelatinas. Estos complejos y/o el As(III) libre pueden secuestrarse en la vacuola. El transporte de raíz a parte aérea (marcado en rojo y azul) es un punto diana sobre el que trabajar en biología molecular para la mejora de cultivos (impedir la translocación) o la hiperacumulación (mejorar el transporte en la planta).

1.7 EL PAPEL DE LAS PLANTAS EN LA RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS Y DEGRADADOS. SUELOS MINEROS ARSENOPIRÍTICOS.

Técnicas de recuperación de suelos. Fitorremediación. Fitoestabilización.

El concepto de suelo contaminado ha ido evolucionando con el tiempo. Un suelo está contaminado cuando la presencia de uno o varios compuestos químicos alteran su funcionalidad o calidad. Tradicionalmente se venía teniendo en cuenta el criterio más sencillo para considerar un suelo contaminado: la concentración total de cada compuesto en el suelo. Si se excedía el valor propuesto estaría contaminado el suelo. Sin embargo muchos autores han criticado esta visión ya que, como hemos visto, la especiación, el fraccionamiento y la disponibilidad/extractabilidad del compuesto en los suelos van a ser parámetros críticos para interpretar el riesgo. En España el Real Decreto 9/2005 establece el modo de determinar los valores guías de sustancias químicas en suelos y la forma de evaluar el riesgo, por lo que se aborda la declaración de suelo contaminado desde una perspectiva toxicológica y del análisis de riesgos (Tarazona y col., 2005). Sin embargo, las comunidades autónomas son los organismos competentes para la declaración de un suelo como contaminado. Por ejemplo la Comunidad de Madrid publicó unos valores de referencia para suelos con distintos usos (Tabla 3). Si se superan los valores referencia deberá realizarse un estudio de riesgos para definir la urgencia de las medidas a tomar.

Tabla 3. Niveles de referencia para metales pesados en la Comunidad de Madrid (mg kg^{-1}). Según usos de suelo: Ind. (industrial), Urb. (urbano), Otro (otros usos). VR90= valor de referencia al 90%.

	Ind	Urb	Otro	VR90		Ind	Urb	Otro	VR90
Ag	500	50	5	0,12	Mo	1500	150	15	0,7
As	40	24	24	24	Ni	15600	1560	405	21
Ba	100000	15200	4200	138	Pb	2700	270	75	30
Be	13	2	2	2,1	Sb	80	8	0,8	0,48
Cd	300	30	3	0,22	Se	3900	390	85	0,24
Co	1500	150	15	12	Sn	100000	46730	46730	4,45
Cu	8000	800	80	20	Tl	30	3	2	0,39
Cr	2300	230	90	32	V	3700	370	37	37
Mn	33900	3390	690	690	Zn	100000	11700	1170	73

*Tomado de las Órdenes 2720/2006 y 741/2007 de la Comunidad de Madrid.

La legislación de los distintos países suele utilizar niveles de arsénico total como valores de referencia, muchas veces condicionados por los distintos usos que se le pueden dar al suelo. La Tabla 4 detalla valores para As en otras comunidades autónomas o en otros países. Algunos países como Holanda describen en su legislación un factor de corrección del valor de As total en función de la materia orgánica y la textura del suelo (VROM, 2009).

Tabla 4. Valores Guía de intervención fijados por distintas administraciones.

	Límite de intervención (mg As kg ⁻¹)
Junta de Andalucía (BOJA, 1999)	
Zonas sensibles	52
Zonas menos sensibles	100
Holanda (VROM, 2009)	76
Reino Unido (DEFRA, 2002)	
Residencial/Agrícola	20
Comercial/Industrial	500
Bélgica (Adriano, 2001)	
Áreas recreativas	200
Áreas residenciales	110

Se estima que sólo en la Unión Europea existen hasta 1,5 millones de lugares contaminados, lo que implicaría un costo estimado de hasta 109 billones de euros para recuperarlos (EC, 2002), 250000 de ellos requieren actuaciones urgentes (Mench y col., 2010). Los aceites minerales y los elementos traza son los principales contaminantes de estos suelos contaminados en la UE (Mench y col., 2009). La magnitud de estos datos, los costes y los impactos que derivan de las tecnologías físicas y químicas provoca que se estén buscando alternativas biológicas que nos permitan abordar un problema de escala global. Por ello, tanto científica como económicamente, han recibido gran atención en los últimos años las técnicas biológicas de descontaminación de suelos.

Las tecnologías usadas para descontaminar suelos pueden clasificarse de forma genérica en tres categorías: tecnologías aplicadas (i) *in situ* (en el emplazamiento contaminado sin mover el suelo), (ii) *on site* (en el emplazamiento pero moviendo el suelo), y (iii) *ex situ* (en otro lugar distinto al que se encuentra el suelo contaminado, implica movimiento y transporte de tierras). Se ha descrito un amplio abanico de alternativas físicas, químicas, biológicas o una mezcla de ellas para la descontaminación de suelos (EPA, http://www.frtr.gov/matrix2/section5/5_3.html). Las tecnologías físicas y químicas, que son las más usadas tradicionalmente, son también las que en ocasiones provocan un mayor impacto en los suelos. Entre las técnicas físicas y químicas podemos citar las que se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Técnicas físicas y químicas de tratamiento de suelos contaminados por elementos traza (modificado de Clemente y col., 2004).

FÍSICAS	Consiste en	Observaciones
Separación física	Retirar la capa de suelo contaminada	Requiere un depósito final (p. ej. vertedero)
Cubierta con suelo no contaminado	Cubrir el suelo contaminado con una capa de suelo de baja toxicidad	Precaución con los lixiviados
Barreras criogénicas	Congelar el suelo	Evita contaminar acuíferos
Procesos térmicos	Aplicar altas temperaturas (1000-2000 °C) al suelo convirtiéndolo en vitrificado	El suelo pierde su estructura y características. Es muy agresivo.
Proceso electrocinético	Aplicar un campo eléctrico a través del suelo provocando la movilización de iones de la solución hacia uno de los polos, donde son bombeados	Se aplica a suelos saturados. Más útil para As, Se y Cr Puede utilizar agentes movilizantes
QUÍMICOS		
Neutralización	Encalado del suelo ácido para disminuir la movilidad de metales	Requiere varias adiciones
Precipitación	Aplicar sulfuros, óxidos de Fe y Mn, carbonatos... para precipitar elementos traza	Se puede utilizar <i>in situ</i>
Adición de enmendantes	Aplicar materia orgánica, óxidos de Fe...	Requiere varias adiciones
Solidificación	Mezclar el suelo con cemento, termoplásticos, limo... formando un material tipo cemento	Se pierden las características del suelo. Tratamiento agresivo
Macro y microencapsulación	Envolver el residuo con una membrana impermeabilizante	Precaución por la posible rotura de la membrana impermeabilizante
Intercambio iónico	Aplicación de minerales de arcilla o zeolitas. El elemento se intercambia por otros iones (Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ ...) que pasan a la solución del suelo	Se necesita aportar un gran volumen de materia
Lavado del suelo	Aplicar ácidos o bases diluidos y agentes complejantes y quelantantes para solubilizar el elemento traza	Precaución con los lixiviados Tratamiento agresivo

La fitorremediación (*phytoremediation*) consiste fundamentalmente en usar plantas para mejorar un problema de contaminación orgánica o inorgánica en el suelo o las aguas (Salt y col., 1998). Chaney y col. (1997) definieron que la fitorremediación de suelos se basa en el uso de plantas, enmiendas del suelo y prácticas agronómicas para eliminar, retener, o disminuir la toxicidad de los contaminantes del suelo. A finales de los años 90 aparecieron frecuentes revisiones y artículos de prospectiva sobre fitorremediación de suelos (Salt y col., 1995, 1998; Cunningham y col., 1995; Cunningham y Ow, 1996; Schnoor y col., 1995; Raskin y col., 1997), que describían todas las técnicas que se engloban dentro de este término (Gonzaga y col., 2006):

i) Fitoextracción: la planta es capaz de acumular cantidades significativas de contaminante en la parte cosechable, que se recogerá para ser debidamente gestionada. Puede ser continua, si se usa una planta hiperacumuladora, o asistida, que implica el uso de agentes movilizantes del contaminante en el suelo. Se ha estudiado frecuentemente para Cd, Zn, Pb, Ni y As. Para el zinc y el cadmio *Thlaspi caeularensce* es una hiperacumuladora cuya capacidad fitoextractora en condiciones controladas ha sido intensamente estudiada. Exceptuando en el caso del Ni, que tendría un valor económico (esta técnica se denomina fitominería, Chaney y col., 2007; Peuke y Rennenberg, 2005), los demás casos presentan la incógnita sobre qué hacer con el residuo vegetal que se genera (Robinson y col., 2006). Otro factor a tener en cuenta es que las plantas pueden acumular solo uno o dos elementos, aunque en muchos casos la contaminación sea multielemental. Con respecto al uso de agentes movilizantes, la técnica presenta también muchas dudas porque los experimentos realizados aconsejan tener muy controlada la lixiviación debido a que el riesgo de dispersión de la contaminación a las aguas es alto (Nowack y col., 2006). En los casos de los suelos mineros, la disponibilidad de los contaminantes suele ser baja y las condiciones no son óptimas para el crecimiento vegetal (Ernst, 2005), por lo que las condiciones no favorecen la aplicación de la fitoextracción. Muchas de las revisiones recientes que siguen incidiendo en la aplicabilidad de la fitoextracción identifican un importante trabajo de ingeniería genética y biología molecular todavía por realizar (Krämer, 2005; Pilon-Smits, 2005; Chaney y col., 2007) para conseguir plantas capaces de crecer en las condiciones ambientales del emplazamiento contaminado y generar suficiente biomasa para realizar la extracción en unos plazos de tiempo realistas. En este sentido, McGrath y Zhao (2003) estimaron que una planta que produjera 10 ton ha⁻¹ debería tener un factor de acumulación (relación de concentración en parte aérea y suelo) de más de 20 para poder reducir en un 50% la contaminación en el suelo en 10 ciclos de cultivo. Esto indica la dificultad de la tarea, por lo que la manipulación genética, molecular y agronómica podrían ser imprescindibles para implementar la fitoextracción (McGrath y Zhao, 2003).

ii) Fitovolatilización: uso de la capacidad de transpiración de las plantas para volatilizar ciertos compuestos. Se ha estudiado tanto para compuestos orgánicos como inorgánicos (Hg, Se). En el caso del As se especula que las plantas puedan volatilizarlo, pero todavía no se ha demostrado su fitovolatilización ni cuantificado su importancia (Zhang y col., 2009).

iii) Fitoinmovilización/fitoestabilización: uso de las plantas para conseguir disminuir de algún modo el riesgo de movilización y transferencia de los contaminantes. Son conceptos íntimamente unidos ya que la presencia de plantas en un suelo lo estabiliza haciéndolo menos susceptible a la erosión y dispersión eólica, pero muchas de ellas también acumulan en raíz elementos contaminantes de forma que dificultan su movilidad y transferencia. En este caso son especialmente interesantes especies autosostenibles que tengan una vida prolongada en el tiempo y estén adaptadas a las condiciones ambientales.

iv) Atenuación natural (Adriano y col., 2004): se ha comprobado que los ecosistemas y el suelo son entidades capaces de autorregularse y que reaccionan ante agresiones químicas de forma lenta, pero consiguen en ocasiones disminuir los riesgos asociados a la presencia de un elemento. Es una técnica consistente en monitorizar la contaminación y esperar a que la biocenosis y el biotopo inactiven la toxicidad del elemento traza. La Agencia Americana de Medio Ambiente (EPA) denomina atenuación natural monitorizada al seguimiento de la contaminación de un suelo de forma que exista suficiente información para asegurar que la situación mejora de forma natural. Es preferible a otros métodos si las alternativas ofrecen dudas económicas o ambientales (Adriano y col., 2004). El término atenuación natural asistida haría referencia a la aceleración de la atenuación natural mediante el uso de medidas de gestión como revegetación o aplicación de enmiendas (Madejón y col., 2006a).

Desde el primer momento se propuso la fitoremediación como una tecnología para la recuperación de suelos competitiva y que prometía resultados, siendo atractiva para los mundos científico y comercial (Peuke y Rennenberg, 2005). Los puntos positivos que se pueden citar de la fitorremediación respecto a sus competidores físico-químicos son: (i) es una tecnología barata, (ii) es menos impactante para el suelo y (iii) está ambiental y socialmente bien vista. Como ejemplo de costes, la siguiente tabla resume unas estimaciones:

Tabla 6. Costes estimados de diferentes tecnologías de remediación de suelos (Padmavathiamma y Li, 2007):

Proceso	Coste (Dólares US ton ⁻¹)	Otros factores
Vitrificación	75-425	Monitorización a largo plazo
Retirada a vertedero	100-500	Transporte/excavación/seguimiento
Tratamiento químico	100-500	Reciclado de contaminantes
Electrocinética	20-200	Seguimiento
Fitoextracción	5-40	Depósito de biomasa

Para ilustrar el interés científico que despierta la fitorremediación de contaminantes inorgánicos en suelos, la Figura 14 detalla las publicaciones recogidas en la base de datos ISI Web Of Knowledge (Thomson Reuters®) a la consulta: "TS="phytoremediation" AND TS="soil" AND (TS="arsenic" OR

TS="metals")". El resultado de dicha búsqueda muestra 992 referencias (62 revisiones) a fecha Diciembre de 2009, siendo creciente la tendencia de número de publicaciones anualmente referidas al asunto. Dichas publicaciones fueron citadas un total de 15939 veces (16,07 citas de media por publicación), con un índice h de 62. Ocho de los artículos fueron citados más de 200 veces.

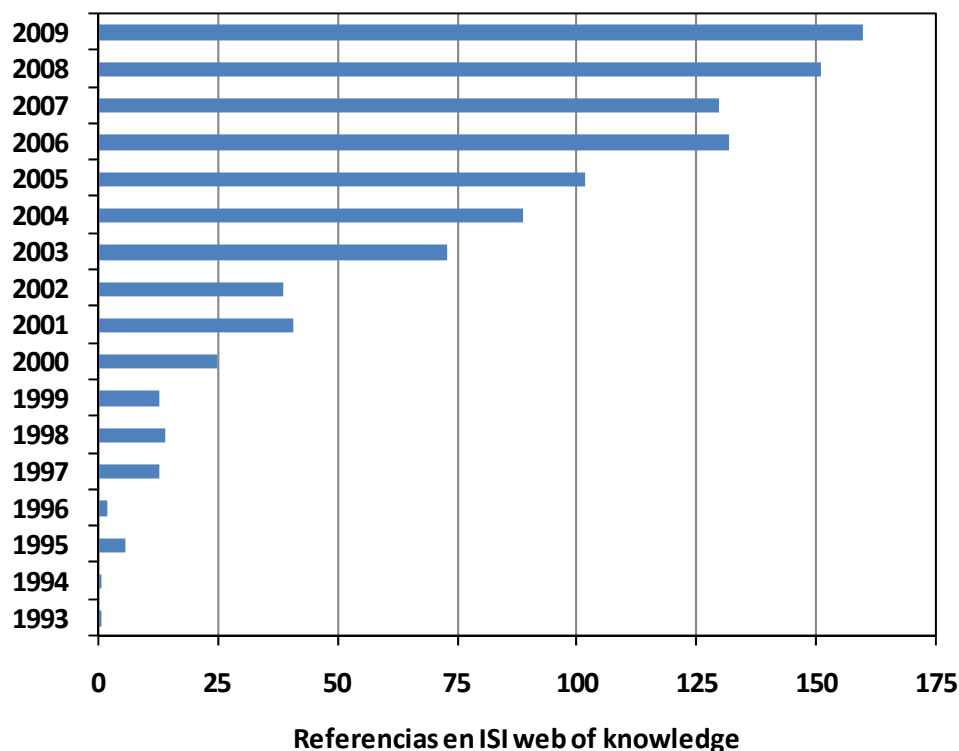


Figura 14. Publicaciones científicas sobre fitorremediación de contaminantes inorgánicos basadas en los resultados de www.sciencedirect.com. Consulta realizada en Febrero de 2010.

Las técnicas de fitorremediación aprovechan un proceso natural impulsado por la energía solar y que tiene varias ventajas potenciales (Mench y col., 2009): (a) utiliza rasgos agronómicos inherentes a las plantas como alta biomasa, sistemas radicales extensos y tolerancia; (b) es una técnica con alta aceptación pública y potencialmente aplicable a grandes extensiones; (c) de bajo coste; (d) de aplicación *in situ*, potencialmente permanente y no intrusiva; (e) optimiza las condiciones del suelo y la rizosfera; (f) evita los problemas asociados a tecnologías físicas y químicas como destrucción del suelo, contaminación secundaria o altos costes; y (g) contribuye al desarrollo sostenible. Entre las técnicas de fitorremediación parecía inicialmente que la fitoextracción (asistida o no) era la más prometedora y sobre la que más esfuerzo desde el punto de vista de la investigación se iba a hacer. En los últimos años (desde el año 2000) continúan realizándose revisiones en este sentido sobre todo en revistas de Fisiología Vegetal, haciendo hincapié en que la manipulación de las plantas y de su rizosfera llevará a conseguir descontaminar en plazos realistas de tiempo (Pilon-Smits, 2005; Chaney y col., 2007; Verbruggen y col., 2009; Verkleij y col., 2009). Sin embargo esta visión no es tan popular entre las revistas de Medio Ambiente, donde han surgido

ciertas críticas a la focalización de los esfuerzos científicos en la fitoextracción. Por ejemplo Van Nevel y col. (2007) consideran que actualmente los tiempos que se estima tarda una planta en disminuir la presencia de un metal en el suelo son demasiado elevados. A su vez, se han descrito dentro una misma especie poblaciones e incluso individuos con distintas capacidades para la absorción y translocación del elemento a descontaminar, por lo que se hace necesario seleccionar ecotipos e incluso individuos capaces de hiperacumular, hecho que complica la técnica (Dickinson y col., 2009). Nowack y col. (2006) cuestionan la aplicación de agentes movilizantes para forzar la acumulación en la planta, sobre todo en lugares con alto riesgo de lixiviación. Ernst (2005) y Robinson y col. (2006) consideran que la fitoextracción no es técnica aplicable en zonas con altas concentraciones de elementos traza y heterogeneidad de la contaminación, identificando además otras dificultades metodológicas: cómo tratar el residuo que se genera, los puntos calientes de contaminación, variables de competitividad económica frente a otras tecnologías... Otro riesgo a tener en cuenta durante la fitoextracción es la transferencia de los contaminantes a la cadena trófica (Mertens y col., 2007; Van Nevel y col., 2007). Robinson y col. (2006) indican que no hay experimentos de fitoextracción en condiciones de campo que hayan tenido éxito, mientras que de fitoestabilización exitosa ha habido hasta el momento numerosas experiencias. A pesar de todas estas críticas, se siguen teniendo esperanzas de que gracias a la selección de especies, poblaciones e individuos, la genética, la biología molecular y las técnicas agronómicas se consiga implementar la fitoextracción en la práctica (Chaney y col., 2007; Alkorta y col., 2004). El problema de la manipulación genética de plantas es la sensibilización social ante los organismos modificados genéticamente, que hace difícil el uso de plantas “a la carta” en Europa especialmente (Rey García, 2002; Peuke y Rennenberg, 2005). Algunos autores opinan que la implantación de la fitoextracción en condiciones reales requiere obtener un valor añadido de la biomasa generada (por ejemplo para generación de energía), lo que haría a la técnica más atractiva (Vangronsveld y col., 2009). En el caso de la fitoextracción de As de suelos contaminados, se ha probado principalmente en estudios en contenedor usando la especie hiperacumuladora *Pteris vittata*, a pesar de que existen descritos otras hiperacumuladoras (Meharg, 2003). La disponibilidad de As en suelos suele ser baja, pero se ha demostrado que dicha especie tiene una rizosfera singular que es capaz de movilizar As incluso de fracciones poco disponibles en suelos (Fitz y col., 2003). En ese caso, se determinó una disminución del potencial redox y un aumento del carbono orgánico disuelto en la zona rizosférica de los helechos que podría inducir la absorción de As. Después de la fitoextracción se comprobó cómo no solo la fracción disponible disminuyó, sino también la cinética del equilibrio de la difusión de As desde el suelo a un gel (técnica DGT: diffusive gradients in thin films), lo que avala la extracción (Fitz y col., 2003). A pesar de los avances realizados con *Pteris vittata*, es una especie cuyo nicho ecológico es restringido, por lo que su aplicación se restringe a terrenos muy particulares, amén de la dificultad para tratar luego los residuos vegetales generados. Como consecuencia, dos revisiones describen la necesidad de que las técnicas genéticas y de biología molecular vegetal sean aplicadas para la fitoextracción de As (Tripathi y col., 2007; Zhu y Rosen, 2009). Además, recientemente se ha comprobado utilizando DGT que la recarga de la fracción de As lábilmente retenida en suelos contaminados se produce a baja velocidad, lo que dificulta la

tarea de la fitoextracción (Cattani y col., 2009). La fitovolatilización no es aplicable al As porque hasta la fecha ni siquiera se ha comprobado la capacidad de las plantas para volatilizar As (Zhao y col., 2009).

En esta tesis nos vamos a centrar en la fitoestabilización/fitoinmovilización/atenuación natural ya que es la que se ha intentado aplicar a suelos contaminados por actividades mineras. Todos los términos están relacionados íntimamente: la fitoinmovilización comprende fitoestabilización y ambas pretenden ser un primer paso hacia la atenuación natural durante la generación un ecosistema autosostenible. Hay otros conceptos asociados a éstos términos también interesantes como son la revegetación y la restauración ecológica de un suelo. Y es que aunque se han acuñado distintos términos, todos ellos confluyen en la acción de las plantas para mejorar el suelo y ayudar al equilibrio y la sostenibilidad ambiental de un emplazamiento. Ahondando en la restauración ambiental, en la fitoextracción el núcleo fundamental sería la técnica en sí misma, conseguir llegar a un objetivo en lo que a concentración de contaminante se refiere, mientras el resto (fito-estabilización e inmovilización y atenuación natural) tienden a la rehabilitación y restauración ecológica del ecosistema en cuestión. A este respecto, Montes (2002) describe como los modelos de restauración ecológica deben ser más complejos que meras actuaciones y requieren de la formación de equipos complejos para abordarlos, pero que son más sostenibles que la actuación más simplista desde un punto de vista biocéntrico. Para ello la restauración ecológica debe redirigirse desde el restablecimiento de poblaciones vegetales y animales a la restauración de las funciones ecológicas, particularmente aquellas percibidas como servicios del ecosistema (Cairns Jr, 2000). En el caso del suelo, no valdría con revegetar y conseguir una disminución del elemento disponible, sino que además habría que recuperar la calidad del suelo para realizar sus funciones, facilitar la sucesión de la comunidad vegetal, crear nichos ecológicos para la fauna, aportar estabilidad hidrológica, etc. Retomando específicamente la fitorremediación, las experiencias en condiciones de campo de fitoestabilización/inmovilización son frecuentes y han dado resultados interesantes para nuestro estado actual de conocimiento, al contrario de lo que pasa con la fitoextracción. Apoyando estas técnicas de fitorremediación encontramos las revisiones generales de Ernst (2005), Robinson y col. (2006) y Dickinson y col. (2009), que defienden la fitoestabilización como la opción más realista actualmente en suelos, a las que se suma una reciente revisión de Mendez y Maier (2008) que reflexiona acerca de las condiciones y condicionantes para la fitoestabilización de suelos en zonas áridas y semiáridas. Entre los factores sobre los que se deberían investigar más específicamente según estos autores están la forma de plantación (semillas o plantas), las enmiendas y acondicionadores necesarios (compost, encalado...) y las necesidades de riego. En la bibliografía se encuentran ejemplos de fitoestabilización desde tiestos en condiciones controladas hasta emplazamientos naturales contaminados usando en ellos una amplia variedad de plantas (Robinson y col., 2006; Vázquez y col., 2006; Jadia y Fulekar, 2009; Martínez-Alcalá y col., 2009; Vemerali y col., 2009). Casi todos estos estudios evalúan la eficacia de la fitoestabilización como una disminución del elemento disponible, pero existen otros factores que deberían ser estudiados como serían la eficacia de la revegetación, las mejoras en la calidad del suelo, la sostenibilidad a largo plazo o los aspectos ecológicos positivos. Adicionalmente, la fitoestabilización puede ser utilizada como una técnica temporal, confinando el

contaminante hasta que pueda ser eliminado o se decida aplicar otra técnica (Vangronsveld y col., 2009). Recientemente se ha acuñado un término relacionado con la fitoestabilización/fitoimmobilización denominado fitoatenuación (phytoattenuation), que consiste en la extracción de la fracción de elemento más disponible en un suelo por la planta, que será cosechada, de modo que disminuye el riesgo asociado a la presencia del contaminante inorgánico en el suelo (Meers y col., 2010). Como la fitoestabilización/inmovilización es una técnica inespecífica permite tratar contaminación multielemental, pero también puede trabajar conjuntamente con otros valores ambientales añadidos (Dickinson y col., 2009): secuestro de carbono (si son especies que generan biomasa), cultivos energéticos, biodiversidad (especies raras o que generan nichos ecológicos específicos), calidad y salud del suelo y protección ante la erosión son líneas transversales que pueden estar comprendidas en una experiencia de fitorremediación. También se puede acoplar a la fitorremediación un valor agrícola añadido: conseguir productos vegetales de interés como alimentos fortificados en Se, Zn o Cu (Bañuelos, 2006; Zhao y McGrath, 2009). Todas estas cuestiones adicionales aportan finalmente un valor añadido a la técnica para hacerla competitiva frente al resto de alternativas en la recuperación de suelos más rápidas, pero que son más caras e impactantes. Un factor a tener en cuenta cuando se pretende poner en práctica la fitoestabilización es que el objetivo final es obtener una cubierta vegetal autosostenible que pueda mantenerse a largo plazo en el lugar recuperado. Por ello deben elegirse especies autóctonas que sean capaces de sobrevivir a largo plazo. En condiciones mediterráneas existe el ejemplo del Corredor Verde en Aznalcóllar (Sevilla) donde se han utilizado una amplia gama de especies autóctonas para revegetar zonas amplias con niveles moderados-altos de metales y As (Domínguez y col., 2008). En el caso del As, se ha demostrado que tanto la atenuación natural como los procesos de fitoestabilización podrían ser útiles en condiciones de campo (Vázquez y col., 2006; Madejón y Lepp, 2007; Domínguez y col., 2008). La fitoestabilización de As puede ser asistida por la adición de enmiendas orgánicas e inorgánicas que mejoren las propiedades del suelo y retengan e insolubilizan el metaloide en el suelo (De la Fuente y col., 2009). Entre las enmiendas inorgánicas que pueden cumplir dichas características tendríamos enmiendas ricas en hierro (lodo rojo, escorias de laminación...), cenizas volantes o materiales encalantes, mientras entre las enmiendas orgánicas parecen más aconsejables para inmovilizar As aquellas con un alto grado de humificación (De la Fuente y col., 2009). En cualquier caso, parece necesario realizar un seguimiento periódico de la contaminación a lo largo del tiempo para asegurar el éxito de la fitoestabilización, independientemente del (los) elemento(s) a tratar (Vangronsveld y col., 2009).

Recuperación de suelos afectados por actividades mineras. Los casos de Aznalcóllar y Bustarviejo.

Como se ha dicho anteriormente, la actividad minera es una de las principales fuentes de contaminación de muchos metales y metaloides en el suelo. Una de las características importantes en este tipo de suelos es que la contaminación suele ser multielemental ya que en las minas el As aparece

asociado a otros sulfuros de Zn, Cu, Pb, etc. (Alloway, 1995). En las zonas afectadas por actividades mineras suele haber unas zonas especialmente problemáticas a recuperar: los escombros y residuos de la actividad (Ernst, 2005). En estas zonas las propiedades edáficas suelen estar fuertemente alteradas (bajo contenido en nutrientes, bajo pH, baja materia orgánica, falta de cubierta vegetal...). El bajo pH suele ser otra de las características que pueden presentarse en suelos afectados por minería de sulfuros. La meteorización de los sulfuros deriva en un exceso de protones que en condiciones de bajo contenido en carbonatos acidifican el suelo, llegando a ocasionar que el pH de los mismos sea inferior a 4 (Vázquez y col., 2006). La reacción de oxidación de la pirita es la siguiente: $4 \text{FeS}_{2(s)} + 15 \text{O}_{2(aq)} + 14 \text{H}_2\text{O}_{(l)} \rightarrow 4 \text{Fe}(\text{OH})_{3(s)} + 8 \text{H}_2\text{SO}_{4(aq)}$ (Urrutia y col., 1987), aunque esta reacción se realiza en varios pasos y catalizada por la actividad bacteriana (p. ej., *Thiobacillus ferrooxidans*) y la presencia del propio ión férrico (Bernal y col., 2007). La acidez puede ser neutralizada por los carbonatos del suelo, pero si son insuficientes y el pH desciende mucho, se puede provocar la liberación de aluminio, también tóxico para las plantas en altas concentraciones.

Los elementos traza tienen distinta movilidad en el suelo. Así los hay dependientes del pH que en condiciones ácidas son muy móviles (Zn y Cd), los hay más dependientes de la materia orgánica soluble (Cu) y los hay poco móviles en suelo (Hg, Pb) (Kabata-Pendias, 2004). Todos ellos comparten características con el As: son fitotóxicos a partir de cierta dosis (aunque algunos son también micronutrientes esenciales para las plantas) y las medidas de gestión del suelo pueden disminuir su riesgo. Subir el pH o añadir P en suelos suele inmovilizar los metales pero moviliza el As. Añadir materia orgánica tiene efectos impredecibles sobre Cu y As, dependientes del carbono orgánico soluble, pero en general suele retener fuertemente los metales (Hartley y col., 2009a-b; Clemente y col., 2008; Bernal y col., 2006). La transferencia de los metales y el arsénico a las plantas es muy dependiente de esta movilidad y disponibilidad. Cd y Zn suelen ser transferidos a la parte aérea de plantas en una mayor tasa que el resto, siendo el As uno de los de menor movilidad bajo condiciones oxidantes (Fellet y col., 2007; Madejón y Lepp, 2007; Lepp y Madejón, 2007).

Suelos contaminados después del desastre ecológico en la zona de Aznalcóllar.

Las minas de Aznalcóllar habían sido explotadas desde los romanos, aunque la minería moderna allí comienza en 1876 (The Seville Sulphur and Copper Co. Ltd.). En 1987 la empresa es comprada finalmente por Boliden Ltd., creando Boliden Aprisa S.L.. La fase mineral consistía en: 83% pirita, 5% esfalerita, 2% galena, 1% calcopirita y 1% de arsenipirita (Simón y col., 1999). En la zona había varios cortes y una balsa minera con cantidad de residuos cargados de sulfuros metálicos y arsénico. El residuo poseía una concentración característica de 0,8-1,1% Pb, 0,5-0,8% Zn, 0,2-0,5% As y 0,1-0,2% Cu (Simón y col., 1999). En 1998 las paredes de la balsa minera cedieron y como resultado, 4,5 hm³ de flujo de lodo cargado de residuos piríticos (con As, Cd, Cu, Fe, y Zn entre otros) se esparcieron en una superficie de

4300 ha siguiendo los ríos Agrio y Guadamar (afluentes del Guadalquivir). El 80% del volumen del residuo era líquido, el otro 20% era residuo sólido. Más del 60% de los suelos contaminados eran de uso agrícola. Las medidas urgentes que se tomaron fueron cerrar las compuertas que regulaban el caudal que llegaba al Parque Nacional de Doñana para impedir su contaminación y la retirada durante los primeros meses de la capa superficial de suelo cargada con los lodos contaminantes. Se prohibió el uso agrícola o cinegético de las zonas contaminadas y muchas fincas fueron expropiadas por la administración.

Los principales contaminantes identificados en los suelos después de producirse el vertido pero antes de la adopción de medidas urgentes fueron Zn (hasta 1500 ppm), Pb (1800), Cu (420), As (590), Sb (150), Cd (6) y Tl (10) (Simón y col., 1999). La oxidación bacteriana de la pirita, tanto del hierro como del sulfuro, ocasionó graves problemas de acidificación (Bernal y col., 2007).

En 6 meses se retiró la capa superficial con el lodo, que se almacenó en la antigua corta de la mina. Una vez retirada esa capa superior, las zonas afectadas todavía quedaba contaminación residual, equivalente a un 5% de residuo en el suelo en algunas zonas (Domenech y col., 2002), debida a la lixiviación de la fase líquida del vertido y a la penetración de partículas sólidas (Bernal y col., 2007). Por ello se realizaron tratamientos químicos para impedir la movilidad de los contaminantes: encalado y adición de óxidos de Fe (Vázquez, 2004). Una vez realizadas las actuaciones urgentes físicas y químicas, la Junta de Andalucía inició un complejo proyecto ecológico en el que se pretendía generar una comunicación entre la Sierra Morena y el Parque Nacional de Doñana a través de la zona que comprende el río Guadamar y sus afluentes (Galán y col., 2002). Se denominó el Proyecto del Corredor Verde y entre otras medidas a largo plazo incluía el seguimiento de la contaminación y la revegetación con especies autóctonas. Es por tanto un ejemplo de fitogestión (phytomanagement) del terreno a largo plazo (Domínguez y col., 2008). Sin embargo en esta zona se mantuvieron algunas parcelas experimentales sobre las que no se actuó después de la retirada física, como es la parcela experimental de El Vicario, que fue utilizada en la presente tesis (Figura 15). Siete años después del accidente, Domínguez y col. (2008) evaluaron la revegetación del Corredor y el estado del suelo, concluyendo que la fitogestión del territorio era satisfactoria hasta el momento. Sin embargo, los niveles de metales en los suelos eran altos, por lo que recomendaba continuar con el seguimiento de la contaminación.

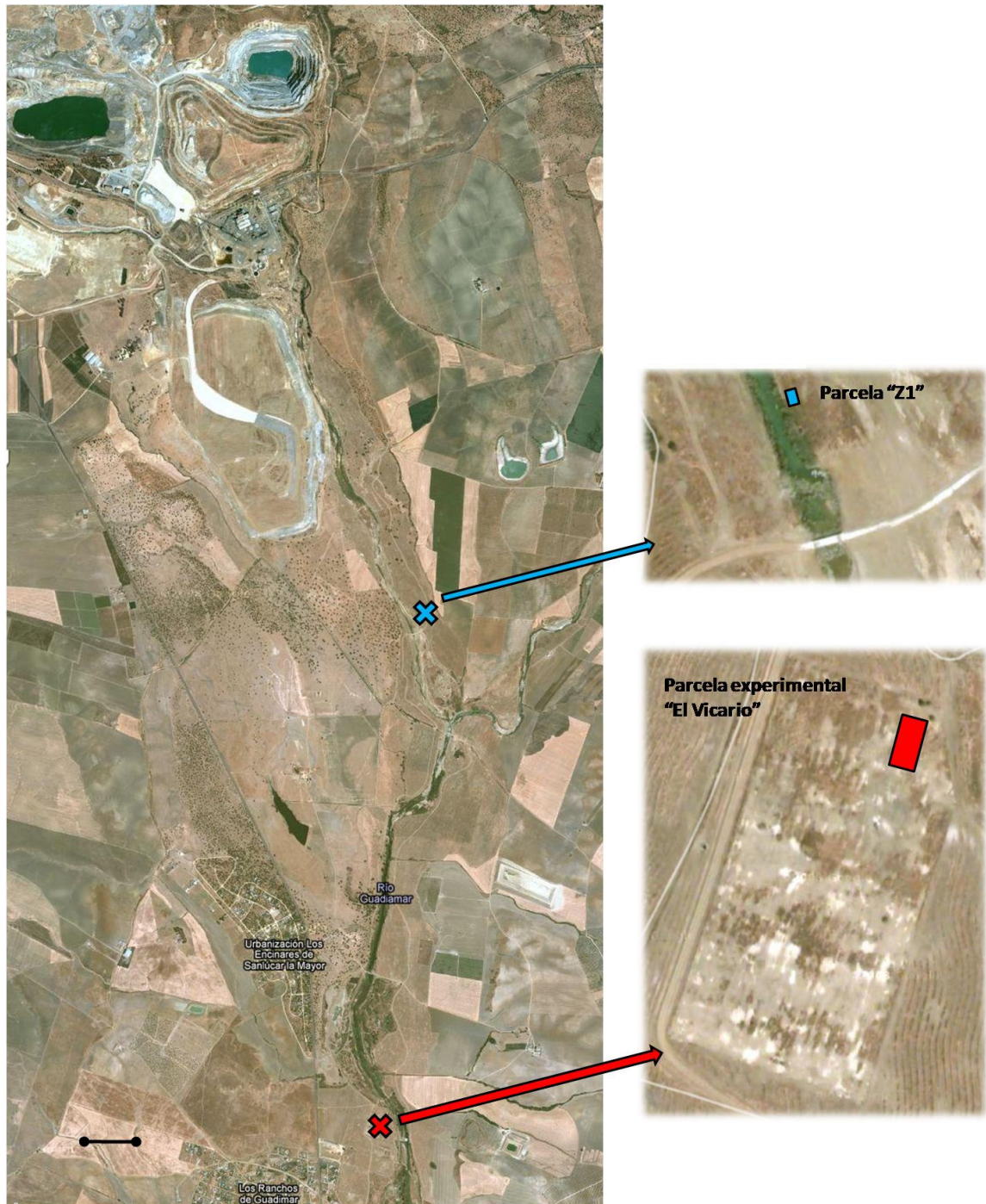


Figura 15. Situación de las zonas de muestreo en la zona de Aznalcóllar. Arriba se aprecia la zona de la mina. En azul se muestra la parcela Z1 y en rojo la parcela experimental utilizada dentro de la Finca "El Vicario". La barra negra son 500 metros. Fuente: Google Maps, modificado.

Impacto de la Mina Mónica (Bustarviejo) sobre los suelos colindantes.

Si los suelos de Aznalcóllar han sido intensamente estudiados después del desastre ecológico, en el caso de la mina de Bustarviejo existían pocos datos sobre el impacto que había producido la actividad minera. Jiménez (2003) había descrito geológicamente la mina: se descubrió en el siglo XV y comenzó su explotación en el XVII, el mineral mayoritario es la arsenopirita con mineralizaciones de matildita. En la década de los años 80 cesó la actividad de la mina. En estos momentos el área de la mina está habilitada para pasear y la mina se encuentra afectada por un proyecto de museo geológico por parte de la Comunidad de Madrid y del Ayuntamiento de Bustarviejo. Además, la zona se utiliza para el pastoreo de vacas y caballos. Existe una zona cercana a la boca de la mina con copiosos cúmulos de estériles mineros con gran pendiente. Por todo ello, el estudio de la contaminación de los suelos y las plantas es importante para conocer la dispersión de los metales, el impacto sobre el suelo y la vegetación y el posible riesgo para la salud humana o el ecosistema. La Figura 16 ilustra el aspecto de la zona de estudio.

Los datos referentes a esta zona de estudio eran escasos, al contrario de lo que ocurría en el caso de la zona de Aznalcóllar. Se reducían a algunos resultados sobre la presencia de metales y As en algunos suelos colindantes a la mina (Gutiérrez-Maroto, comunicación personal), situada en la esquina superior derecha en la Figura 16. Dos arroyos que confluyen aguas debajo de la mina drenan las aguas que han entrado en contacto con los residuos mineros.

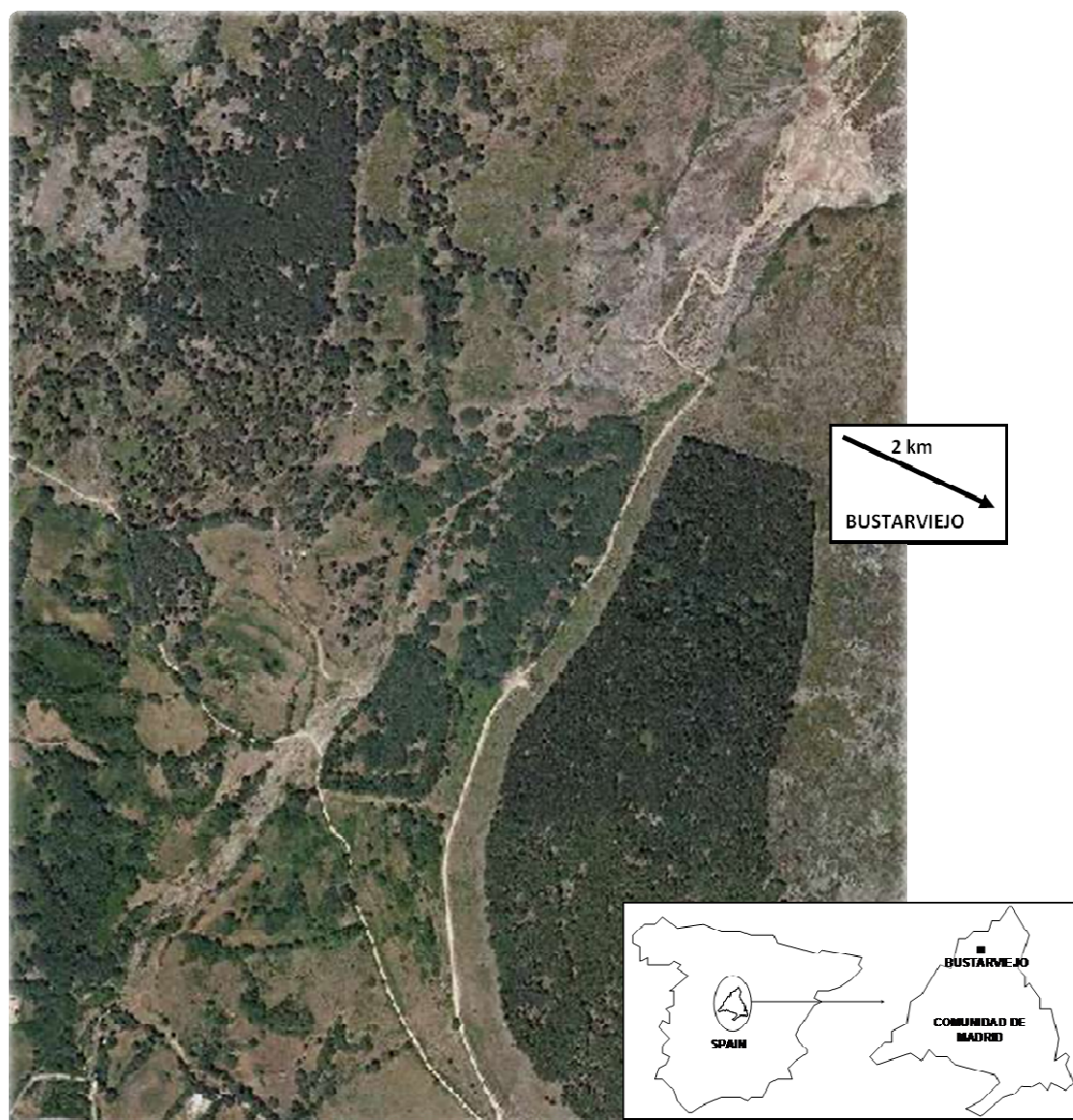


Figura 16. Fotografía aérea de la zona sometida a estudio. Fuente: Cartoteca Digital de la comunidad de Madrid (modificada). La parte superior derecha es la zona de la mina.

Objetivos - Objectives

2. OBJETIVOS

El **objetivo fundamental** de esta tesis es estudiar el comportamiento de plantas autóctonas mediterráneas frente al arsénico, la transferencia este elemento desde los suelos mineros a las plantas y evaluar su utilidad para la fitorrecuperación de suelos contaminados con As.

Para ello, se desarrollarán los siguientes **objetivos parciales**:

1. Establecer una metodología de extracción y análisis de As en el sistema suelo-planta.
2. Estudiar el comportamiento frente al As de distintas especies autóctonas utilizadas en revegetación de suelos mediterráneos, y el efecto que produce el cultivo vegetal sobre la disponibilidad del As y sobre la calidad de suelos mineros contaminados.
3. Seleccionar, entre la flora presente en un emplazamiento contaminado, especies con propiedades interesantes para la fitorremediación de suelos arsenopiríticos.
4. Evaluar el fraccionamiento y la disponibilidad del As en los suelos estudiados, así como el impacto a largo plazo de la presencia de raíces vegetales en la redistribución del As en dichos suelos.
5. Integrar los resultados obtenidos a distintas escalas y sus implicaciones para la aplicación de fitotecnologías de recuperación de suelos.

2. OBJECTIVES

The **main objective** of this Thesis is to study how Mediterranean native plants cope with arsenic, the transfer of this element from the mine soils to plants and the usefulness of some of plant species for phytoremediation of As-polluted mine soils.

To deal with this global aim, several **partial objectives** will be investigated:

1. To develop a valid methodology for extracting and analyzing As in the soil-plant system.
2. To study how native plant species used in Mediterranean soil re-vegetation can cope and accumulate As and which can additionally deplete As available fraction and improve As mine soil quality.
3. To select another interesting plant species for soil phytoremediation from the native vegetation growing in a mining site with high As levels in soils.
4. To evaluate As availability and fractionation in the studied soils, and the viability of phytostabilisation of As-polluted soils by studying the release and re-distribution of As during root mineralization.
5. To combine the outcomes from experiments at different scales to identify the implications for the implementation of phytotechnologies in As-polluted mine soils.

Capítulo 3

3. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: i) Biodisponibilidad de metales y arsénico en un suelo ácido contaminado: uso de altramuiz para validar los métodos de extracción; ii) Métodos de digestión para extraer arsénico de muestras de suelo y vegetales.

i) BIODISPONIBILIDAD DE METALES Y ARSÉNICO EN UN SUELO ÁCIDO CONTAMINADO: USO DE ALTRAMUZ PARA VALIDAR LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

Objetivo: Seleccionar un método de extracción de elemento disponible para las plantas que sea aplicable en suelos ácidos con contaminación simultánea de metales y arsénico.

Materiales y métodos

Recogida de suelos

Se recogieron 9 suelos en el área contaminada de Aznalcóllar, 8 en la Finca El Vicario, parcela experimental B2, y 1 en la zona aguas arriba Z1 (Figura 17). Las muestras de suelo fueron recogidas de los primeros 20 cm, secadas al aire durante 7 días y tamizadas a 2 mm.

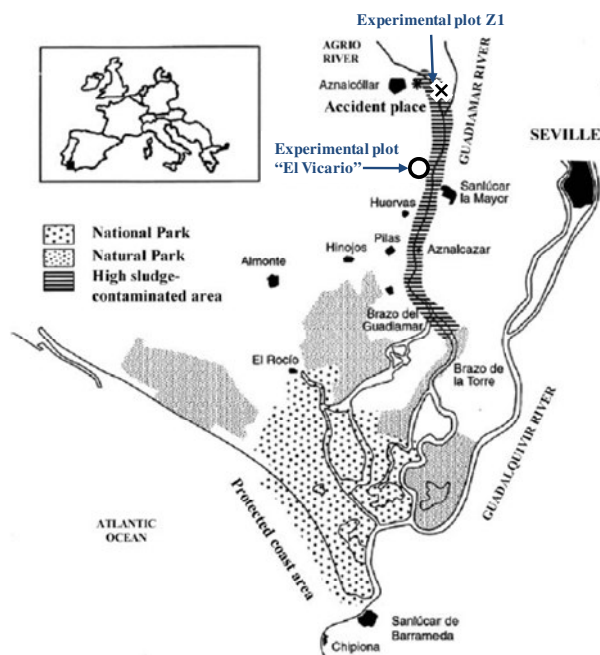


Figura 17. Situación de las parcelas experimentales (El Vicario y Z1) con respecto al área contaminada por el vertido de Aznalcóllar (modificado de Vázquez y col., 2006).

Los suelos de esta parcela en general tienen bajo contenido de materia orgánica oxidable (1-2%), son franco-arenosos y el contenido de carbonatos <0,1% (Vázquez y col., 2006). El pH se determinó en pasta saturada después de una estabilización de 30 min (MAPA, 1994). Las muestras de suelo (0,5 g) se digirieron con 10 mL agua regia (3:1, HCl:HNO₃) en microondas (Chen y Ma, 2001). Las digestiones se filtraron y enrasaron a 50 mL, y se determinó en cada muestra la concentración de metales y As por espectroscopía de absorción atómica y fluorescencia atómica respectivamente.

Cultivo vegetal y procesamiento de muestras

Se esterilizaron las semillas de altramuz (*Lupinus albus* L. cv. Marta) en lejía comercial diluida al 10% y se germinaron sobre papel de celulosa, humedecido con agua y CaSO₄ 1 mM, en oscuridad, a 28 °C durante 3 días. Las plántulas se mantuvieron sobre perlita humedecida con disolución nutritiva: 3 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 4 mM KNO₃, 1,5 mM KH₂PO₄, 36 µM Fe-EDDHA, 34,4 µM MnSO₄, 1,3 µM CuSO₄, 1,5 µM ZnSO₄, 92,5 µM HBO₃ y 1,2 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, diluida 10 veces. Para elaborar las disoluciones se utilizó agua destilada y el pH de la disolución se ajustó a 5,5. Después de 5 días, las plántulas se transfirieron a tiestos de plástico llenos de suelo (0,7 L). Se trasplantaron cuatro plántulas por tiesto, con tres replicados en un diseño experimental en bloques al azar. Los suelos se regaron con agua destilada al 70% de su capacidad de campo mediante pesada. Las plantas de altramuz crecieron en una cámara de cultivo a 18-21 °C, con una humedad relativa del 40-60% y un fotoperiodo de 11 h de luz, 13 h de oscuridad. Después de 21 días, las plantas se muestrearon, separando raíz y parte aérea. El material vegetal fue cuidadosamente lavado con agua de grifo y agua destilada. Previamente, las raíces se habían lavado al grifo de forma minuciosa para retirar partículas de suelo.

El material se secó durante 3 días a 60 °C y se molió. Se pusieron 0,5 g de planta en frascos de autoclave y se realizó la digestión en HNO₃:H₂O₂:H₂O 3:2:10 durante 30 minutos (Lozano-Rodríguez y col., 1995). El filtrado se enrasó a 25 mL y se determinaron en él los metales y el As mediante las mismas técnicas que para el suelo.



Figura 18. Aspecto del ensayo con los distintos suelos utilizados sobre los que se cultivaron plantas de altramuz.

Extracciones de suelo

El suelo de los tiestos se recogió, secó y tamizó a 2 mm. Se probaron los siguientes métodos de extracción: cloruro cálcico, nitrato sódico, el primer paso de los métodos de extracción secuencial de Wenzel y col. (2001), el recomendado por Community Bureau of Reference (BCR), *RHIZO* y AB-DTPA. Se procedió del siguiente modo:

- CaCl₂: 2 g de suelo en 20 mL CaCl₂ 0,01 M agitados durante 3 h (Novozamsky y col., 1993).
- NaNO₃: 8 g de suelo en 20 mL de NaNO₃ 0,1 M agitados durante 2 h (Gupta y Aten, 1993).
- Wenzel (NH₄)₂SO₄: 2 g de suelo en 20 mL de (NH₄)₂SO₄ 0,1 M agitados durante 4 h (Wenzel y col., 2001).
- BCR: 1 g de suelo en 20 mL de ácido acético 0,11 M (pH 2.85), agitado durante 16 h (Davison y col., 1999).
- RHIZO*: 2 g de suelo en 20 mL de una solución con ácidos orgánicos de bajo peso molecular, con una concentración de 0,01 M en ácido acético, láctico, cítrico, málico y fórmico en una proporción 4:2:1:1:1 (c/c), agitados durante 16 h (Feng y col., 2005).
- AB-DTPA: 5 g de suelo en 20 mL de DTPA 5 mM-NH₄HCO₃ 1 M, ajustado a pH=7,6 con amonio, agitados durante 2 h (Soltanpour y Workman, 1979).

Las soluciones se agitaron en frascos estériles de plástico de 60 mL a 180 rpm a temperatura ambiente (20 °C). Un blanco de cada extractante sin suelo se agitó también. Las muestras fueron filtradas (Whatman 42) y el extracto se utilizó para determinar metales y As.

Determinación de arsénico

El arsénico se determinó mediante fluorescencia atómica en un equipo Millenium Excalibur System de P S Analytical. Previamente a la determinación analítica, el arsénico de la muestra es prerreducido por ión yoduro en medio ácido, y posteriormente es reducido a arsina por BH_4^- . Por tanto, los reactivos necesarios para la determinación son: (1) 10 g L^{-1} KI de en una matriz de HCl al 25% (v:v) y ácido ascórbico 0,2% (p:v); (2) 8 g L^{-1} de NaBH_4 en una matriz de NaOH al 0,4% (p:v). Los reactivos utilizados en la determinación de As tenían una calidad “para análisis”, de las marcas PANREAC® o Sigma-Aldrich®. Todo el arsénico reducido a arsina es arrastrado por una corriente de argon hacia la llama, que utiliza como combustible el H_2 generado en la oxidación del borohidruro, donde se atomiza y la concentración de As se cuantifica por fluorescencia. Para la determinación se usaron curvas de calibrado en dos rangos: 0-40 ppb As para muestras ricas en As y 0-4 ppb para muestras menos enriquecidas (Manual PSA 10.055, P S Analytical, Kent, UK). En adelante, las determinaciones de arsénico por fluorescencia atómica se realizarán del modo que se acaba de describir.

Análisis estadístico de los datos

Se realizaron correlaciones entre la concentración de elementos traza en suelo utilizando distintos extractantes y su concentración en raíz y parte aérea de planta. Para estimar la bondad de la regresión se utilizó el coeficiente de determinación (R^2). Los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS 11.5.

Resultados

La Tabla 7 muestra el pH y la concentración total de As, Fe, Cd, Cu, Mn y Zn en los 9 suelos elegidos. El pH de las muestras se encontró entre 2,12 y 6,41. Las plantas de altramuza no fueron capaces de sobrevivir a los suelos con menor pH (muestras 7 y 13), que tuvieron un pH inferior a 2,9. Las plantas que crecieron sobre el suelo 5 (pH=2,9) mostraron síntomas de toxicidad (Figura 19), mientras las plantas del resto de tiestos se desarrollaron normalmente. Aunque la concentración total de Cd en suelos estuvo comprendida entre 0,8 y 4,8 mg kg^{-1} , no se detectó Cd en los extractos vegetales o de suelo distintos al total, por lo que ha sido eliminado de la evaluación de los métodos de extracción. El número de suelos se redujo por tanto a siete (1, 5, 10, 18, 19, 28 y Z1) para la comparación de los métodos de extracción.

La tabla 8 muestra los coeficientes de determinación de la regresión lineal entre las concentraciones de elementos traza en los órganos vegetales (raíz y parte aérea) y las encontradas en los suelos utilizando distintos extractantes. Como regla general, las correlaciones entre concentración en planta y aquellas estimadas por los métodos *RHIZO* y *Wenzel* ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) fueron altas. También se obtuvieron buenas correlaciones con el Cu, Zn y As extraído con cloruro cálcico y con el Zn y As extraído con nitrato sódico.

Tabla 7. pH y concentración total de los elementos (mg kg^{-1}) en nueve suelos de la zona afectada por el vertido minero de Aznalcollar. Media \pm error estándar.

Suelos	pH	Fe	Mn	Cu	Zn	Cd	As
1	4,13	19483 \pm 553	427 \pm 17	49 \pm 2	179 \pm 6	0,8 \pm 0,6	49 \pm 3
5	2,91	25298 \pm 29	298 \pm 4	66 \pm 2	193 \pm 4	2,3 \pm 0,8	135 \pm 4
7	2,85	23483 \pm 243	320 \pm 6	63 \pm 1	226 \pm 18	2,1 \pm 0,4	120 \pm 2
10	3,27	20887 \pm 324	323 \pm 2	68 \pm 0	173 \pm 2	2,4 \pm 0,5	101 \pm 4
13	2,12	27057 \pm 256	264 \pm 6	78 \pm 1	234 \pm 5	3,2 \pm 0,2	164 \pm 5
18	5,90	21205 \pm 238	331 \pm 6	88 \pm 1	221 \pm 3	3,3 \pm 0,3	103 \pm 2
19	6,41	19551 \pm 201	580 \pm 5	58 \pm 1	303 \pm 4	4,1 \pm 0,7	62 \pm 2
28	4,41	19218 \pm 547	479 \pm 4	56 \pm 1	218 \pm 2	2,6 \pm 0,3	54 \pm 1
Z1	4,12	50792 \pm 1034	244 \pm 10	193 \pm 2	556 \pm 17	4,8 \pm 0,8	176 \pm 2

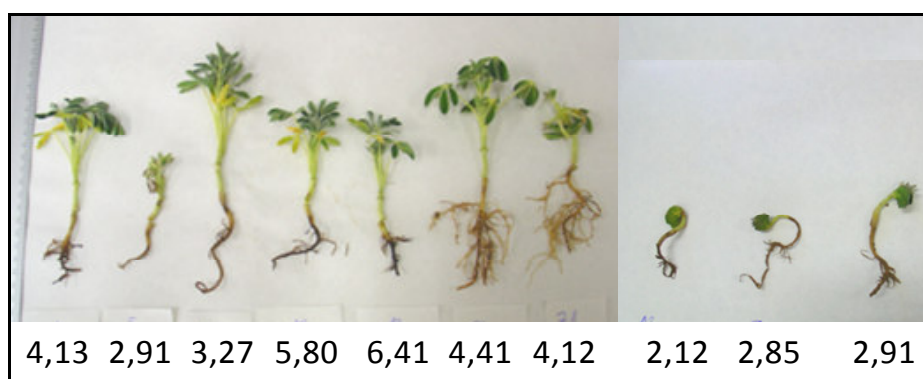


Figura 19. Aspecto de las plantas de altramuз cultivadas en distintos suelos de la zona afectada por el vertido de Aznalcóllar. Debajo de cada planta se muestra el pH del suelo sobre el que fueron cultivadas.

Tabla 8. Coeficientes de determinación (R^2) entre las concentraciones de elementos en órganos vegetales (parte aérea y raíz) y los determinados en suelos por distintos métodos de extracción.

R^2		AB-DTPA	BCR	RHIZO	CaCl ₂	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄
As	PA	0,171	0,565	0,725	0,566	0,797	0,685
	Raíz	0,071	0,671	0,858	0,845	0,724	0,771
Cu	PA	0,014	0,324	0,883	0,860	0,390	0,895
	Raíz	0,071	0,388	0,922	0,871	0,432	0,924
Zn	PA	0,796	0,697	0,837	0,885	0,845	0,920
	Raíz	0,882	0,793	0,920	0,934	0,851	0,975
	Media	0,335	0,573	0,857	0,827	0,674	0,862

Nota: Las concentraciones de Cd estuvieron por debajo de los límites de detección.

La Figura 20 muestra el porcentaje de elemento extraído por cada uno de los métodos de extracción de elemento disponible en relación con el contenido total en suelo. La figura muestra un diagrama de cajas y bigotes. La estructura de este tipo de gráfico esta basada en una caja, donde el límite superior corresponde al valor del tercer cuartil (75% de los datos) y el límite inferior al primer cuartil (25%); a su vez dentro de la caja se incluye una línea representando el valor de la mediana. Además se incluye dos barras verticales (bigotes), los cuales determinan la distancia o rango del 95% de los casos; adicionalmente el procedimiento anexa algunos símbolos representativos de los valores atípicos y extremos. En general, los extractantes que contenían sales neutras mostraron menor capacidad para extraer el arsénico y los metales del suelo, mientras que la extracción con DTPA fue la más fuerte.

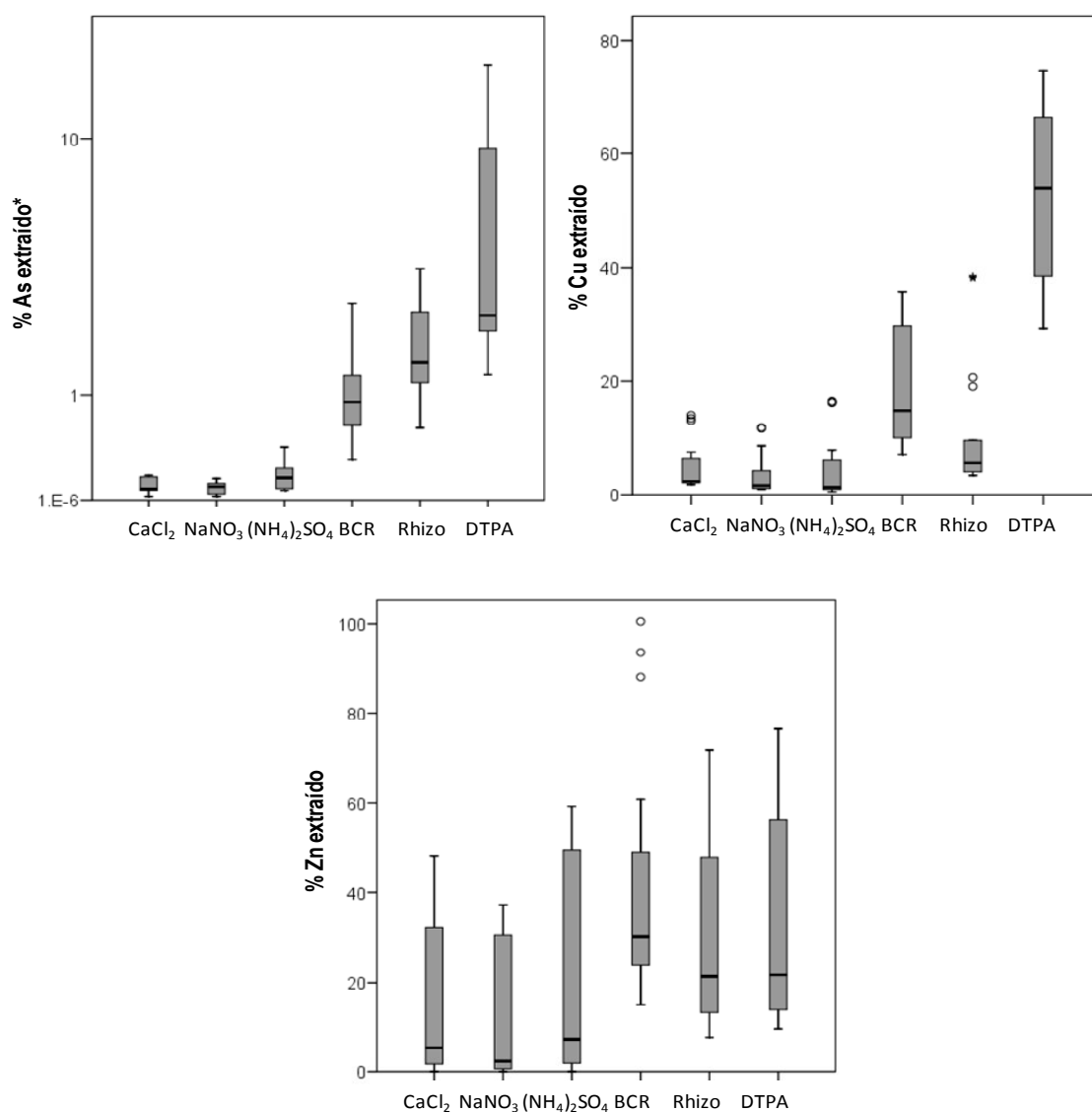


Figura 20. Porcentaje de elemento extraído (As, Cu y Zn) respecto al contenido total en las muestras de los 7 suelos analizados. Los datos no se ajustaban a una distribución normal, por lo que se realizó un análisis no paramétrico mediante un test de Kruskal-Wallis para establecer la significación de las diferencias observadas entre métodos de extracción: para todos los elementos, As, Cu y Zn, hubo diferencias significativas al 0,1%. *: los datos de porcentaje de arsénico se muestran en una escala logarítmica.

Discusión

Los resultados confirmaron el drástico efecto que tiene un pH excesivamente ácido para las plantas de altramuza, confirmando que la acidificación debida a la oxidación de la pirita es un factor limitante para las plantas. En los suelos 7 y 13 ($\text{pH} < 2,9$) la fuerte acidez causó la muerte vegetal, de acuerdo con lo que habían observado Vázquez y col. (2006). La oxidación de los sulfuros a sulfatos en la zona del vertido de Aznalcóllar es el motivo de la acidificación de estos suelos (Simón y col., 2005). Los síntomas de toxicidad parecen comenzar cuando el pH del suelo estuvo por debajo de 3, como es el caso del suelo 5.

Como regla general los coeficientes de correlación entre el elemento extraíble y los órganos vegetales (Tabla 8) fueron mejores cuando se utilizan las raíces que cuando se tiene en cuenta la parte aérea. Sin embargo las diferencias observadas en nuestro experimento fueron menores que las observadas por Feng y col. (2005). La concentración de elemento extraíble con AB-DTPA y EDTA en suelo se correlacionó pobremente con la concentración en planta. El AB-DTPA extrae de forma efectiva los elementos metálicos porque forma complejos muy estables con los iones metálicos (Lindsay, 1979). Adicionalmente, el AB-DTPA también extrae más eficientemente el As del suelo que los otros métodos testados, probablemente por la solubilización del Fe (Azizur Rahman y col., 2009), la presencia de carbonatos que pueden desplazar el arseniato del suelo (Gräfe y Sparks, 2006) y el pH básico del extractante (7,6), lo que moviliza el As (Fitz y Wenzel, 2002). Del mismo modo pero en menor medida, el BCR fue un indicador pobre de la disponibilidad. El fuerte cambio de pH que genera la solución de ácido acético (pH inicial de 2,85) sobre el suelo incrementa la solubilidad de los metales. Para suelos con carbonatos este método puede presentar limitaciones, ya que disolverá los carbonatos de la muestra, una fracción que no suele ser disponible. Tanto el AB-DTPA y el primer paso de la metodología BCR son extracciones más fuertes que las sales neutras, lo que les hace menos útiles para la determinación del elemento disponible porque extraen más elemento del que puede tomar la planta, sobreestimando el elemento disponible (Kabata-Pendias, 2004). Los métodos basados en sales inorgánicas extrajeron menor proporción de elementos pero presentan buenos coeficientes para algunos elementos. Así el As, Cu y Zn extraíble con cloruro cálcico y el As y Zn extraíble con nitrato amónico mostraron buenas correlaciones con las concentraciones en planta. Feng y col. (2005) también obtuvieron buenas correlaciones con estos métodos para Zn y Cu respectivamente. Sin embargo en nuestro caso el paso 1 de la extracción secuencial para As propuesta por Wenzel y col. (2001), basado en el uso de una solución de sulfato amónico, mostró buenas correlaciones con la concentración en planta para todos los elementos. Nuestros resultados apuntan a que puede extenderse el uso de este primer paso para la determinación de metales y As disponibles para las plantas en suelos contaminados multielementalmente. Finalmente, el método *RHIZO* (que simula lo que ocurre en la rizosfera) mostró los coeficientes de correlación más elevados. Feng y col. (2005) obtuvieron

resultados similares. Todo ello sugiere que los métodos que imitan la interacción suelo-raíz son válidos como indicadores de la disponibilidad en suelos afectados por lodos piríticos.

Conclusiones

Los métodos *RHIZO* y *Wenzel* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ son los métodos de extracción química más recomendados para evaluar la disponibilidad de As, Cu y Zn en suelos ácidos multicontaminados usando el altramuza como especie modelo. El método *RHIZO* tiene algunos problemas asociados que le hacen metodológicamente más problemático, debido a que crecen rápidamente microorganismos en el extracto y que el tiempo de extracción es mayor. Por ello, en adelante se utilizará la extracción con sulfato amónico de forma rutinaria para evaluar la fracción disponible en suelos para las plantas.

ii) MÉTODOS DE DIGESTIÓN PARA EXTRAER ARSÉNICO DE MUESTRAS DE SUELO Y PLANTA.

Objetivo: Validar un método de digestión de muestras de suelos y plantas para la determinación de arsénico total.

Materiales y Métodos

Materiales de suelo y planta

Todas las muestras utilizadas estaban secas y molidas a un tamaño de partícula <0,5 mm. Se escogieron específicamente para este estudio diferentes muestras certificadas:

- Hojas de tabaco: CTA-VTL-2.
- Líquen: BCR482.
- Suelo arcilloso: CRM051-050.
- Suelo arenoso: CRM048-050.

Adicionalmente se utilizaron también muestras no certificadas: hojas de *Salix atrocinerea* procedente de una zona contaminada cercana a Bustarviejo (Madrid), un suelo neutro de la Finca “El Vicario” (Aznalcóllar, Sevilla) con baja materia orgánica y pH cercano a 7 y otro suelo procedente de una zona minera de Bustarviejo (Bustar) con 7% de materia orgánica y pH en torno a 4. En el experimento 2, se analizaron los contenidos de metales en suelos de tres parcelas de Aznalcóllar, dos ácidas con distinto grado de contaminación (5 y Z1, Tabla 7) y una neutra (19).

Métodos de extracción

EXPERIMENTO 1: validar la extracción de As mediante digestión en autoclave.

La metodología está basada en la propuesta por Lozano-Rodríguez y col. (1995). Para planta se siguió estrictamente dicha referencia: a 0,5 g de tejido seco se añadieron 10 mL de agua mili-Q, 3 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de agua oxigenada. Para los suelos, se modificó de modo que se enrasase a 50 mL manteniendo las concentraciones finales de ácido nítrico y agua oxigenada: se mezclaron 0,5 g de suelo, con 4 mL de agua mili-Q, 6 mL de ácido nítrico concentrado y 4 mL de agua oxigenada. Las muestras fueron digeridas en autoclave (SELECTA Autoester-G) a 125 °C y 1,5 kPa durante 30 minutos, se filtraron y se enrasaron con agua mili-Q a 25 mL o 50 mL respectivamente en el caso de plantas y suelos.

Todas las muestras se replicaron 5 veces para estimar la variabilidad del método. Para ambos métodos se realizaron 5 blancos en paralelo a la digestión de las muestras.

El As se determinó en los extractos vegetales y de suelo como se detalla en el experimento anterior.

EXPERIMENTO 2: comparar la extracción en autoclave con el método de microondas con agua regia.

a) Autoclave: se mezclaron 0,5 g de suelo, con 4 mL de agua mili-Q, 6 mL de ácido nítrico concentrado y 4 mL de agua oxigenada. Las muestras fueron digeridas en autoclave (SELECTA Autoester-G) a 125 °C y 1,5 kPa durante 30 minutos, se filtraron y se enrasaron con agua mili-Q a 50 mL.

b) Microondas (Método EPA 3051): 0,5 g de suelo se sumergieron en 7,5 mL de ácido clorhídrico y 2,5 mL de ácido nítrico en tubos de teflón. Los tubos se situaron en el carrusel, que se introdujo en el microondas (MARS-Xpress) para poner un programa a 600 W y 100 °C con una rampa de 10 min y 20 min de digestión. El resultado se filtró y enrasó a 50 mL con agua mili-Q.

Análisis de los datos

Se calcularon la media y la desviación típica para cada muestra. Para cada media se determinó el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación.

Resultados y discusión

En el experimento 1 se validó el método de extracción de As en muestras de suelo y plantas mediante su digestión en autoclave. La Tabla 9 resume los valores certificados, los resultados que se obtuvieron con autoclave y los coeficientes de variación para cada método. También se incluyeron muestras sin certificar para evaluar la repetibilidad.

Los porcentajes de recuperación del arsénico en las muestras certificadas fueron aceptables, en todas las muestras se obtuvo un porcentaje superior al 80%, de lo que se desprende que el método de autoclave es válido para extraer el arsénico pseudo-total tanto en suelos como en plantas. La recuperación de elementos de muestras certificadas es aceptable, pero además, el coeficiente de variación fue inferior al 10% en todos los casos, por lo que los resultados serán reproducibles. En el ensayo de Lozano-Rodríguez y col. (1995) los resultados de coeficiente de variación y recuperación fueron bastante similares, llegando a la conclusión de que era una técnica válida para el análisis mineral de muestras vegetales. En la bibliografía son frecuentes también porcentajes de recuperación para suelo y planta similares a los obtenidos en este trabajo (Lozano Rodríguez y col., 1995; Bettinelli y col., 2000). Si nos fijamos en los porcentajes de recuperación, se observa que el método no es capaz de extraer el 100% del As en la muestra, pero los porcentajes son altos, por lo que debería denominarse As pseudo-total. Si se hubiera realizado una extracción más fuerte (mediante calcinación previa o mineralización nítrico-perclórica) se hubieran obtenido probablemente mayores porcentajes de recuperación. Sin embargo, para el objetivo de esta tesis, la

mineralización realizada en este ensayo nos será de utilidad, ya que las digestiones pseudo-totales son un buen indicador del elemento total. De aquí en adelante se considera esta fracción extraída mediante digestión en medio nítrico y oxidante en autoclave como el elemento total.

Tabla 9. Experimento 1: Valores certificados, resultados autoclave obtenidos por el método propuesto de extracción de As en muestras de suelo y planta mediante digestión en autoclave. Se muestra la recuperación (Rec) y el coeficiente de variación (CV).

Muestra	Valor certificado (μg As g ⁻¹)	Autoclave		
		Media ± DT (μg As g ⁻¹)	Rec (%)	CV (%)
Suelo				
CRM051-050	22.7	20,3 ± 0,3	90	1,5
CRM048-050	150	133,1 ± 6,4	89	4,8
Bustarviejo	-	727,3 ± 6,5	-	0,9
Vicario	-	69,6 ± 1,3	-	1,9
Plantas				
CTAVL2	0.97	0,94 ± 0,02	97	2,4
BCR482	0.85	0,69 ± 0,05	81	6,6
Salix	-	1,72 ± 0,05	-	3,2

La tabla 10 resume los resultados obtenidos en el experimento 2, en el que se compara un método de extracción fuerte en suelos con agua regia con la extracción en autoclave con ácido nítrico y agua oxigenada:

Tabla 10. Concentraciones de As total en suelos de Aznalcóllar usando distintos métodos de digestión (Media \pm ET, $n=3$).

Muestra	mg As kg^{-1} suelo	
	Microondas	Autoclave
5	135,1 \pm 3,7	141,6 \pm 8,2
19	61,5 \pm 2,5	54,4 \pm 1,0
Z1	176,0 \pm 2,1	180,4 \pm 0,2

El análisis estadístico mediante *t-student* de los resultados de la tabla 8 detalla cómo no se obtuvieron diferencias significativas entre los métodos de extracción del As en suelos (significación de 0,77). Por tanto la concentración de As evaluada por cada método no es estadísticamente diferente a la obtenida por el otro. La digestión de muestras de suelo usando microondas con agua regia es un método ampliamente extendido entre la comunidad científica para la extracción y posterior análisis de la cantidad

total de elementos traza en una muestra (Elke y col., 1996; Bettinelli y col., 2000; Cao y col., 2004; Gulz y col., 2005). El método de autoclave proporciona resultados comparables a dicha extracción.

Conclusión

El método de extracción de arsénico en muestras vegetales y de suelo mediante una digestión con nítrico y peróxido de hidrógeno usando autoclave es válido y comparable a aquellos resultados obtenidos mediante agua regia en microondas. En adelante será el método que utilizaremos para la digestión de muestras vegetales y elemento total en suelos.

Capítulo 4

4. COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA AL ARSÉNICO DE VARIOS ARBUSTOS MEDITERRÁNEOS FRECUENTEMENTE UTILIZADOS EN TAREAS DE REVEGETACIÓN.

Objetivo: Estudiar la capacidad de acumulación de As por distintos arbustos mediterráneos, así como su resistencia y los efectos tóxicos producidos en las plantas. Elección de candidatas para experimentos de fitorremediación de suelos contaminados.

Materiales y Métodos

Selección de especies ensayadas

Las plantas que se usaron en este estudio fueron cedidas por el vivero de San Jerónimo (Junta de Andalucía). Las especies vegetales objeto de estudio fueron: *Arbutus unedo* L. (madroño), *Pistacea lentiscus* L. (lentisco), *Myrtus communis* L., *Retama sphaerocarpa* L. (retama), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Tamarix gallica* L. (taray). La selección de dichas especies se realizó entre las que se venían utilizando en el proyecto de restauración ecológica del Corredor Verde del Guadiamar por parte de la Junta de Andalucía y se utilizarán en los ensayos de los Capítulos 4, 5, 6 y 7. Todas ellas son especies que se han usado frecuentemente en revegetación de suelos mediterráneos, pero cuya utilidad en zonas afectadas por arsénico no ha sido comprobada hasta la fecha. De hecho, el potencial de especies leñosas plurianuales en fitorremediación no ha sido estudiado en suficiente detalle (Fuentes y col., 2007). Las características de estas plantas son (Galán Cela y col., 2003):

- *Pistacea lentiscus* L. (lentisco):

Descripción: Arbusto denso y perennifolio de hasta 3 m, que puede llegar a desarrollarse como arbolillo de 6-7 m. Ramas gruesas y fuertes, de corteza grisácea y agrietada en las partes viejas, rojizas las más jóvenes, que son además portadoras de una resina aromática. Hojas paripinnadas, con el raquis alado, lampiñas, también aromáticas. Folíolos 6-12, ovales u oblongos, sentados, enteros, coriáceos, lampiños y acabados en un breve mucrón. Flores unisexuales, cada sexo en plantas separadas, dispuestas en racimos densos, más cortos que la hoja que los axila, de color rojo o amarillo verdoso. Carecen de pétalos. Las masculinas tienen un cáliz gamosépalo con 5 lóbulos y 5 estambres con las anteras purpúreas y más largas que el filamento. Las femeninas tienen 3-4 lóbulos en el cáliz y un pistilo súpero acabado en 3 estigmas. El fruto es una drupa poco carnosa, cortamente pedicelada, redondeada, apiculada, de color rojo que se oscurece al madurar. Los racimos de frutos son también compactos y más cortos que la hoja que los axila.

Hábitat: Planta circunmediterránea y canaria. En la Península es muy abundante en el centro, este y sur. Se encuentra en Baleares. Forma parte de matorrales de tipo mediterráneo en zonas de altitud baja o media, o encinares térmicos. Es indiferente edáfica. Requiere climas secos y cálidos ya que no resiste las heladas. Da lugar a formaciones muy estables, en las que puede llegar a ser dominante, puesto que si se corta rebrota bien desde la cepa. Es frecuente que entren a formar parte de estos matorrales romeros, acebuches, diversos espinos y jaras, mirtos, palmitos, cornicabras, incluso majuelos y brezos, lo que nos da idea del interés ecológico de estas formaciones, cuya densidad proporciona refugio para buen número de animales.

• *Myrtus communis* L. (mirto):

Descripción: Arbusto perennifolio, inerme, que puede alcanzar hasta 6 m. Ramillas jóvenes aristadas de color castaño. Hojas opuestas de tamaño variable, entre 20-45 mm, algo coriáceas, con un pecíolo muy corto (< 3 mm), elípticas, acuminadas, enteras, aromáticas. Flores solitarias en posición axilar, sostenidas sobre largos pecíolos, aromáticas. Cáliz pequeño, verde, con 5 dentecitos. Corola blanca, pentámera. Androceo con multitud de estambres. Gineceo de ovario ínfero. El fruto es de tipo baya, menor de 1 cm de diámetro, de color azul-morado hasta negro, con 5 dientes en el extremo, aromático.

Hábitat: Natural de la región mediterránea, Portugal y costa atlántica marroquí. En la Península Ibérica se distribuye por toda la vertiente mediterránea y cuencas de los ríos Guadalquivir, Guadiana y Tago. Especie algo exigente en agua, poco tolerante a los fríos invernales y que no se desarrolla muy bien sobre suelos calizos. Característica de ambientes de encinares y alcornocales.

• *Arbutus unedo* L. (madroño):

Descripción: Árbol perennifolio o semicaducifolio, muy ramificado, de ramas purpúreas o pardo-rojizas. Hojas escumiformes, agudas, glabras, con glándulas secretoras de sales. .

Hábitat: Dispersa por el oeste y sur de Europa, norte de África, Oriente Medio y Macaronesia. Ampliamente distribuida en la Península y Baleares. Se encuentra en bosques de encinas, alcornoques y quejigos, también en pinares y en jarales o brezales, muchas veces sobre suelos pedregosos o roquedos, en climas no excesivamente fríos o secos.

• *Retama sphaerocarpa* L. (retama):

Descripción: Arbusto caducifolio y sin espinas, puede alcanzar 3,5 m, de tonalidad general un poco verdeazulada. Las ramillas finas están estriadas, generalmente curvadas hacia el suelo; tienen un abundante indumento de pelos cortos y aplicados, que tienen un aspecto algo brillante. Hojas alternas, simples, pequeñas (aprox. 6 mm), de vida efímera, típicamente menos de un mes. Flores dispuestas en racimos laterales. Cáliz corto, con 2 labios poco marcados, el superior dividido en 2 dientecillos y el inferior terminado en 3 diminutos apéndices que resultan poco visibles a simple

vista. Androceo con 10 estambres soldados. Es de la familia de las leguminosas y puede generar asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno. El fruto no recuerda morfológicamente a una legumbre, ya que es ovoideo o elipsoidal, coriáceo e indehisciente, con un pequeño mucrón en el extremo. Lleva en su interior 1 (2-3) semilla sin estrofiolo.

Hábitat: Natural del suroeste de la Península Ibérica, noroeste de África e Islas Canarias. Especie xerófila que vivir en zonas de clima cálido, capaz de desarrollarse en todo tipo de terrenos, pero en su ambiente natural vegeta sobre arenales costeros estabilizados. Muy común en pinares costeros de *Pinus pinea* desde Setúbal a Cádiz. Se ha empleado con frecuencia en jardinería y plantaciones de carreteras a partir de las cuales pueden asilvestrarse.

• *Rosmarinus officinalis* L. (romero):

Descripción: Arbusto o mata perennifolio que puede alcanzar 2 m, fuertemente aromático. Ramas pardas, erectas y ascendentes; las juveniles con pubescencia blanca que va perdiendo al madurar. Hojas lineares, coriáceas, perennes, bruscamente agudas, verdeoscursas por el haz, con márgenes revolutos, blanquecinas por el envés, sésiles. Flores de 10-12 mm, que nacen en pequeñas cimas laterales. Cáliz bilabiado de forma acampanada, tomentoso en sus primeras etapas, luego presenta pilosidad esparcida. Corola de color azul más o menos intenso, violácea o, en ocasiones, blanca. Estambres 2, muy extensos.

Hábitat: Se distribuye en el Mediterráneo occidental, fundamentalmente la Península Ibérica y norte de África. En España predomina en la mitad sur y parte de la meseta norte, así como en la depresión del Ebro, donde encuentra su límite hacia el noreste; también se encuentra en Baleares. Vive en matorrales secos y bosques aclarados, en ambientes de bosques esclerófilos, en laderas y collados de tierras bajas; también en roquedos costeros y dunas fijadas, etc.

• *Tamarix gallica* L. (taray):

Descripción: Arbusto o arbolito caducifolio de hasta 10 m. Ramas purpúreas o pardo oscuras. Hojas escumiformes, agudas, con escasa gándulas secretoras de sales. Flores pequeñas y agrupadas en racimos compactos, tetrámeras o pentámeras, blancas o rosadas, generalmente con 5 estambres cuyos filamentos se insertan en un disco nectarífero más o menos carnoso. Ovario con 3-4 carpelos, sin estilos. Brácteas más cortas que el cáliz. Fruto en cápsida. Semillas provistas de un penacho de pelos simples en el ápice.

Hábitat: Habita en Europa occidental y es relativamente frecuente en la Península y Baleares. Se localiza en bordes de los cursos de agua, depresiones salinas y arenales marítimos. Pueden tolerar niveles altos de salinidad en el suelo. Actualmente se utilizan en reforestación de taludes y medianas de carreteras.

Cultivo vegetal

Las plantas tenían un año de edad y un tamaño similar a las utilizadas en replantaciones: 15-20 cm y 13-16 g. Después de lavar intensamente la raíz de la planta con agua, cada planta se transfirió a un tiesto que contenía 17 L de perlita como sustrato y 2 L de disolución nutritiva (Figura 21). La disolución, que tenía un pH de 6,5 y se renovaba cada 9 días, tenía la siguiente composición: 1.5 mM KNO₃, 1.5 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 0.75 mM K₂SO₄, 53.76 µM Fe-EDDHA, 27.3 µM MnSO₄, 0.32 µM CuSO₄, 0.77 µM ZnSO₄, 46.25 µM H₃BO₃, 0.016 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄. Las plantas se aclimataron durante 9 días al sistema hidropónico manteniéndolas con disolución control antes de aplicar los tratamientos. Los tratamientos, que fueron añadidos como NaH₂AsO₄, fueron 0, 5, 50, 250 y 500 µM de As. Las dosis de romero y taray fueron diferentes al resto en base a experimentos previos: al romero solo se le aplicaron las dosis 0, 5 y 50, mientras al taray 0, 50, 250, 500 (Bueno y col., 2004). Al resto de plantas se les aplicó 0, 5, 50, 250 µM As. La disolución nutritiva de los tiestos se renovó cada 9 días. Las plantas crecieron en el invernadero de la Universidad Autónoma de Madrid entre los meses de Abril y Julio, bajo unas condiciones de 10-28 °C y 50-80% de humedad. Cada tratamiento se replicó 3 (romero y taray) o 4 veces (el resto de especies). En la Figura 21 se detalla el tipo de tiesto utilizado en el cultivo y la Figura 22 ilustra el cultivo de lentisco, romero y taray en invernadero.

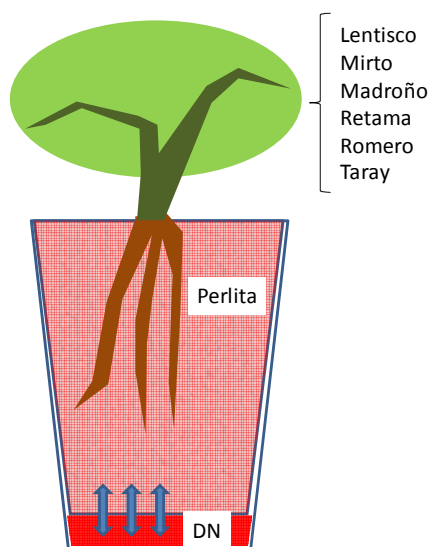


Figura 21. Esquema resumido del tiesto usado durante el experimento.



Figura 22. Detalle del cultivo de las plantas de romero, lentisco y taray (de izquierda a derecha).

Cosecha de las plantas y procesamiento de muestra

Inicialmente 3 o 4 plantas de cada especie fueron muestreadas para determinar el peso y contenido de elementos antes de empezar el tratamiento. Dichas muestras se procesaron igual que las de los tratamientos.

Las plantas de las seis especies vegetales tratadas con distintas dosis de As se recogieron y se separaron en raíz, tallo y hojas (tallos verdes en el caso de la retama y el taray). Las raíces fueron lavadas con especial intensidad con agua del grifo inicialmente. Posteriormente, las raíces y partes aéreas se lavaron en agua de grifo y agua destilada. El material fue pesado en fresco, una parte se secó a 60 °C durante 3 días y el resto se almacenó a -20 °C. Después de seco, el material vegetal se volvió a pesar.

Determinaciones analíticas

Para la mineralización ácida, se pesaron 0,50 g de material vegetal (0,20 g para taray y lentisco) y se digirieron en 10 (4) mL de agua mili-Q, 3 (1,3) mL de ácido nítrico y 2 (0,9) mL de agua oxigenada durante 30 minutos a 125 °C y 1,5 kPa (Lozano-Rodríguez y col., 1995). El líquido resultante se filtró (Wathman 42) y se enrasó con agua mili-Q a 25 (15) mL. El extracto se envió para análisis mediante ICP-MS al Sidi-UAM, y una parte se reservó para determinar P colorimétricamente con reactivo Duval mediante la medición del color azul de las muestras usando vidrio libre de P (MAPA, 1994).

Las clorofilas de 0,5 mg de hoja se extrajeron con 50 mL de acetona al 80%. La absorbancia en el extracto se determinó a 645 y 663 nm y el contenido de clorofilas se estimó mediante las ecuaciones de Wellburn (1994).

El MDA es un producto de la peroxidación de lípidos en membranas biológicas, por lo que se convierte en una medida de estimación del estrés oxidativo en tejidos vegetales. Se pesaron 0,10 g de material vegetal fresco y se añadió 1 mL de reactivo colorimétrico TCA-TBA-HCl-BHT [15% (w/v) ácido tricloroacético (TCA), 0,37% (w/v) ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), 0,25 M ácido clorhídrico (HCl) con 0,01% de hidroxitolueno butilado (BHT)] (Heath and Packer, 1968). Se agitó y la suspensión resultante se calentó en

baño de agua durante 30 min a 90 °C. Posteriormente, se centrifugó 5 minutos a 11000 rpm y se recogió el sobrenadante para la determinación colorimétrica del MDA a 535 nm. Se restó la absorbancia a 600 nm para corregir la turbidez no específica que presentan los sobrenadantes de las muestras. La concentración de MDA se calculó utilizando $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción molar.

La determinación de tioles se realizó según describe Jocelyn (1987). Se pesaron 0,10 g de material vegetal fresco y se añadieron 400 μL de una solución extractante de NaOH 0,1M conteniendo 25 mg mL^{-1} de NaBH_4 . Se agitó y la suspensión resultante se centrifugó 5 min a 11000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se eliminó el exceso de NaBH_4 mediante la adición de 100 μL HCl 35% seguido de agitación y centrifugación durante 5 minutos a 11000 rpm. Finalmente, sobre 500 μL de sobrenadante se añadieron 500 μL de reactivo colorimétrico, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) 300 μM en tampón fosfato 0,5 M a pH= 7,5, para la determinación colorimétrica de los compuestos tiólicos a 412 nm. La cuantificación de los tioles se realizó mediante una curva de calibrado utilizando glutation como patrón.

El procedimiento de extracción de la pared celular se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Vázquez y col. (2006b), utilizando muestras de raíz de lentisco y taray expuestas a 50 y 250 μM As. El residuo final obtenido tras sucesivos pasos fue considerado la fracción correspondiente a pared celular. Dicha fracción se procesó de igual modo que el material vegetal seco (Lozano-Rodríguez y col., 1995).

Procesado y tratamiento de los datos

Los parámetros que se calcularon fueron:

- Incremento relativo del crecimiento: se calculó este parámetro como índice del crecimiento de las plantas durante el estudio hidropónico, de forma que se elimina el efecto de la biomasa inicial de las plantas (Moreno-Jiménez y col., 2007).

$$\text{RGI (relative growth increment)} = \frac{gPF_{t=60} - gPF_{t=0}}{gPF_{t=0}}, \text{ donde } g \text{ PF son el peso fresco en gramos}$$

de la planta.

- Acumulación efectiva de As: porcentaje de As que absorbe la planta completa en comparación con la cantidad aplicada en la disolución nutritiva a lo largo del cultivo.

$$\text{Acumulación efectiva (\%)} = 100 \cdot \frac{\text{mg As planta}^{-1}}{\text{mg As añadidos en la disolución nutritiva}}.$$

- La EC_{50} (dosis de As para la que el RGI disminuyó en un 50%) se calculó mediante ajuste en SigmaPlot 10.0 ®. Los datos de RGI se ajustaron usando la curva la apropiada para evaluar EC_{50} según dicho programa.

El análisis estadístico de los datos se realizó con SPSS 15.0 ®, realizándose un análisis de varianza de dos factores con interacción para determinar la influencia de los factores (especie y tratamiento) sobre los parámetros estudiados. Los datos que se muestran son las medias \pm error estándar.

Resultados

Crecimiento vegetal

La Figura 23 ilustra las diferencias en el aspecto de plantas de madroño y retama al final del cultivo con distintas dosis de As. Los síntomas visuales que pudieron constatarse fueron amarillamiento y necrosis foliar para la dosis de 250 μM de As en alguna planta de madroño, mirto y lentisco. La presencia de As en la disolución nutritiva generalmente disminuyó la biomasa e inhibió el crecimiento de las especies vegetales estudiadas (Figura 23; Tabla 11). El análisis de varianza realizado mostró diferencias significativas al 0,1% causadas (a) por la dosis de As, que ralentizó el crecimiento, (b) por la especie, ya que no todas las especies tuvieron la misma velocidad ni el mismo patrón de crecimiento, y (c) por la interacción del tratamiento de As con cada especie, ya que no todas responden igual a las dosis crecientes de As. En el caso del mirto se observa un incremento de la biomasa para la dosis más baja de As (5 μM), que luego se torna en un descenso con respecto al control para la dosis 50 μM .

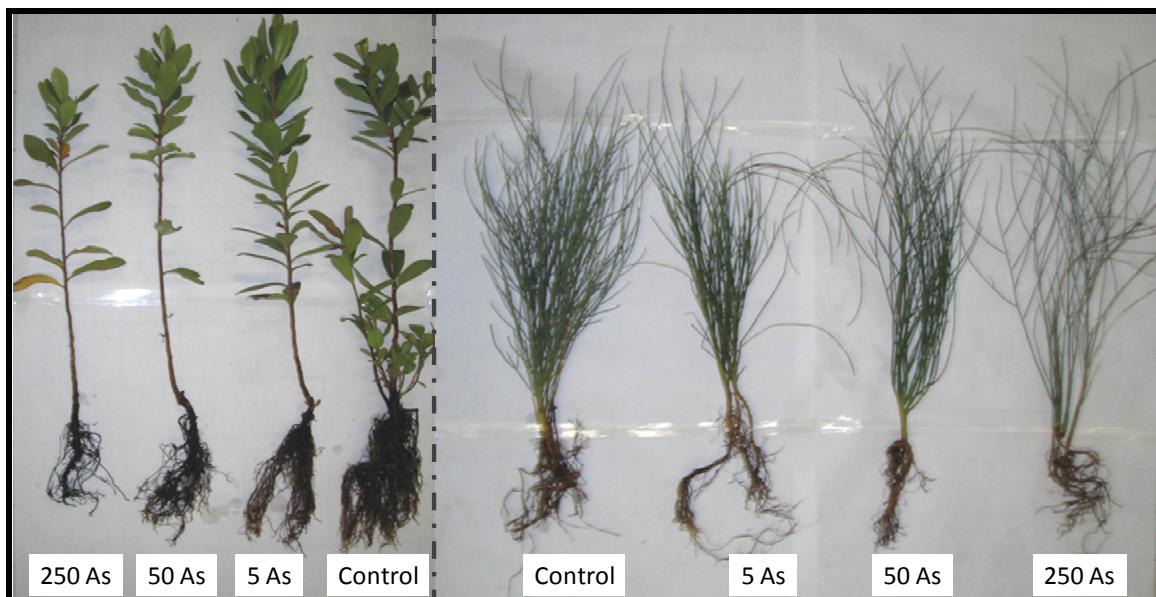


Figura 23. Aspecto de las plantas de madroño y retama (de izquierda a derecha) al final del cultivo durante 2 meses con distintas dosis de As en la disolución nutritiva.

Tabla 11. Incremento relativo del crecimiento (RGI, $n= 3-4$) en raíz y parte aérea de lentisco, mirto, madroño, retama, romero y taray después de 2 meses de tratamiento con distintas dosis de As (Media \pm Error Típico (ET)). Los datos fueron analizados por un ANOVA de 2 factores con interacción, la significación de los factores se resume al final de la tabla: n.s.= no significativo; *= significativo al 5%; **= significativo al 1%; ***= significativo al 0,1%.

	Dosis As (μ M)				
	Control	5	50	250	500
<i>P. lentiscus</i>					
Parte aérea	3,45 \pm 0,30	2,41 \pm 0,21	2,20 \pm 0,14	0,91 \pm 0,22	-
Raíz	4,86 \pm 0,46	2,27 \pm 0,21	1,93 \pm 0,30	0,10 \pm 0,03	-
<i>M. communis</i>					
Parte aérea	4,19 \pm 0,13	6,65 \pm 0,44	3,18 \pm 0,31	0,70 \pm 0,19	-
Raíz	1,81 \pm 0,10	2,87 \pm 0,21	1,00 \pm 0,25	0,61 \pm 0,01	-
<i>A. unedo</i>					
Parte aérea	1,69 \pm 0,25	1,64 \pm 0,13	0,80 \pm 0,09	0,12 \pm 0,12	-
Raíz	2,54 \pm 0,15	1,75 \pm 0,13	0,90 \pm 0,17	0,08 \pm 0,14	-
<i>R. sphaerocarpa</i>					
Parte aérea	2,62 \pm 0,32	2,47 \pm 0,37	2,27 \pm 0,12	1,05 \pm 0,12	-
Raíz	1,69 \pm 0,19	1,32 \pm 0,08	1,10 \pm 0,11	0,41 \pm 0,18	-
<i>R. officinalis</i>					
Parte aérea	1,18 \pm 0,09	0,49 \pm 0,04	0,38 \pm 0,16	-	-
Raíz	2,62 \pm 0,21	0,73 \pm 0,34	0,46 \pm 0,15	-	-
<i>T. gallica</i>					
Parte aérea	1,80 \pm 0,11	-	1,83 \pm 0,18	1,21 \pm 0,04	1,00 \pm 0,18
Raíz	2,63 \pm 0,40	-	1,74 \pm 0,37	0,76 \pm 0,41	0,21 \pm 0,22
ANOVA	RGI _{PA}		RGI _{raíz}		
Especie	***		***		
Tratamiento	***		***		
Esp*Tto	***		***		

La dosis de As que reduce en un 50% el crecimiento (EC_{50}) se muestra en la Tabla 12. En todas las especies se observaron valores más altos para parte aérea que para raíz. La retama y el taray son las especies que obtuvieron los valores más altos de este parámetro, y el romero el presentó los menores.

Tabla 12. Valores de EC_{50}^* (μM As) para el crecimiento de raíz y parte aérea evaluado mediante el RGI en las especies vegetales estudiadas. *Calculado mediante ajusté a una curva logística estándar de cuatro parámetros característicos del programa SigmaPlot® (*Four Parameters Logistic Curve*).

Especie	EC_{50} raíz*	EC_{50} hoja*
Romero	1,85	5,61
Lentisco	2,95	51,7
Madroño	15,1	46,5
Mirto	33,5	87,8
Taray	94,3	232
Retama	118	205

*Curva usada:

$$\left[y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}} \right)^{Hillslope}} \right]$$

Concentración y acumulación de arsénico en tejidos vegetales.

La concentración de As en tejidos vegetales aumentó tanto en parte aérea como en raíz de todas las especies en respuesta a las dosis crecientes de As en la disolución nutritiva (Tabla 13). Mientras que la concentración de As en parte aérea estuvo influenciada por la especie vegetal, el tratamiento de As y la interacción de ambos factores ($P < 0,001$), la concentración en raíz solo estuvo influenciada por la dosis aportada en el medio de cultivo ($P < 0,001$). Ninguna de las especies demostró una sobresaliente capacidad para concentrar el As en sus tejidos en comparación con el resto de especies estudiadas, aunque el taray fue el más hábil para la dosis de 250 μM .

Tabla 13. Concentración de arsénico ($\mu\text{g As g}^{-1}$ PS, $n= 3-4$) en raíz y parte aérea de lentisco, mirto, madroño, retama, romero y taray después de 2 meses de tratamiento con distintas dosis de As (Media \pm ET). Los datos fueron analizados por un ANOVA de 2 factores con interacción, la significación de los factores se resume al final de la tabla: n.s.= no significativo; *= significativo al 5%; **= significativo al 1%; ***= significativo al 0,1%.

		Dosis As (μM)				
		Control	5	50	250	500
<i>P. lentiscus</i>						
Parte aérea		0,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1	6,3 \pm 0,4	12,3 \pm 0,8	-
Raíz		0 \pm 0	17 \pm 1	146 \pm 11	315 \pm 12	-
<i>M. communis</i>						
Parte aérea		0,2 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0	6,2 \pm 0,5	16,9 \pm 1,3	-
Raíz		0 \pm 0	25 \pm 2	138 \pm 6	235 \pm 7	-
<i>A. unedo</i>						
Parte aérea		0,0 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	5,2 \pm 0,3	5,8 \pm 0,3	-
Raíz		0 \pm 0	36 \pm 5	185 \pm 21	208 \pm 9	-
<i>R. sphaerocarpa</i>						
Parte aérea		0,2 \pm 0,0	1,6 \pm 0,3	5,9 \pm 0,5	23,9 \pm 1,7	-
Raíz		1 \pm 0	11 \pm 1	91 \pm 16	208 \pm 16	-
<i>R. officinalis</i>						
Parte aérea		0,0 \pm 0,0	2,1 \pm 0,5	5,8 \pm 0,7	-	-
Raíz		0 \pm 0	26 \pm 0,8	95 \pm 11	-	-
<i>T. gallica</i>						
Parte aérea		0,0 \pm 0,0	-	5,9 \pm 0,6	33,2 \pm 2,7	68,2 \pm 5,5
Raíz		0 \pm 0	-	294 \pm 32	594 \pm 53	1530 \pm 98
ANOVA		[As] _{PA}	[As] _{raíz}			
Especie		***	n.s.			
Tratamiento		***	***			
Esp*Tto		***	n.s.			

La relación $[\text{As}]_{\text{PA}}/[\text{As}]_{\text{raíz}}$, la acumulación efectiva y el porcentaje retenido en raíz con respecto al total en planta (Tabla 14) se vieron influenciadas por la especie, el tratamiento ($P < 0,001$) y la interacción especie-tratamiento ($P < 0,01$). *A. unedo* fue el que menor tasa de translocación de As mostró, tanto en relación parte aérea-raíz (0,01-0,03) como en acumulación en parte aérea (3-7%). Mientras que *R. sphaerocarpa* y *M. communis* obtuvieron la mayor relación parte aérea-raíz de concentración de As dependiendo de la dosis de As (0,08-0,14), *R. officinalis* y *T. gallica* mostraron el mayor porcentaje de As retenido en la parte aérea (22-43%). Con respecto a la acumulación efectiva, que indica la habilidad para absorber el As de la disolución nutritiva respecto al total añadido, el patrón general observado es a una

disminución cuando aumenta la dosis de As en la disolución nutritiva. Destacaron por su capacidad para acumular el As *M. communis* para la dosis menor (5,5%) y *T. gallica* para las dosis altas (2,4%).

Tabla 14. Relación $[As]_{PA}/[As]_{raiz}$, porcentaje de As acumulado en parte aérea respecto al contenido total (% As PA) y acumulación efectiva (%) en las plantas (Media, $n= 3-4$). Los datos fueron analizados por un ANOVA de 2 factores con interacción, la significación de los factores se resume al final de la tabla: n.s.= no significativo; *= significativo al 5%; **= significativo al 1%; ***= significativo al 0,1%.

		Dosis As (μM)				
		Control	5	50	250	500
<i>P. lentiscus</i>						
$[As]_{PA}/[As]_{raiz}$	-		0,076	0,043	0,039	-
% As PA	-		29	17	18	-
Ac. ef. (%)	-		2,0	1,5	0,3	-
<i>M. communis</i>						
$[As]_{PA}/[As]_{raiz}$	-		0,051	0,058	0,072	-
% As PA	-		11	8	11	-
Ac. ef. (%)	-		5,5	1,5	0,6	-
<i>A. unedo</i>						
$[As]_{PA}/[As]_{raiz}$	-		0,011	0,028	0,028	-
% As PA	-		3	5	7	-
Ac. ef. (%)	-		3,8	1,3	0,3	-
<i>R. sphaerocarpa</i>						
$[As]_{PA}/[As]_{raiz}$	-		0,140	0,065	0,123	-
% As PA	-		26	11	23	-
Ac. ef. (%)	-		1,5	1,2	0,5	-
<i>R. officinalis</i>						
$[As]_{PA}/[As]_{raiz}$	-		0,081	0,061	-	-
% As PA	-		39	32	-	-
Ac. ef. (%)	-		2,8	1,0	-	-
<i>T. gallica</i>						
$[As]_{PA}/[As]_{raiz}$	-		-	0,020	0,056	0,045
% As PA	-		-	22	43	32
Ac. ef. (%)	-		-	3,1	1,6	2,4
ANOVA						
		$[As]_{PA}/[As]_{raiz}$	% As PA	Ac. ef.		
Especie	***	***	***	***		
Tratamiento	***	***	***	***		
Esp*Tto	**	**	**	***		

Efectos sobre el fósforo

La concentración de P en órganos vegetales se vio afectada por el tratamiento de As ($P < 0,001$), por la especie vegetal ($P < 0,001$) y por su interacción sólo en parte aérea ($P < 0,05$) (Tabla 15). A mayor dosis de As, la concentración de P en los tejidos vegetales disminuyó. Lentisco, taray y retama mostraron los valores de P más altos. Se calculó adicionalmente la relación molar P/As en los órganos vegetales (Figura 24), la cual disminuyó según aumentó la dosis de As aportada en el tratamiento. Esta relación fue mayor en parte aérea que en la raíz. Se muestra una zona crítica de relación molar entre el nutriente y el tóxico para la que comenzaron a observarse otros síntomas asociados a toxicidad por As en las plantas (disminución del crecimiento y del contenido en clorofilas, estrés oxidativo y síntesis de tioles).

Tabla 15. Concentración de fósforo (mg P g^{-1} PS, $n=3-4$) en raíz y parte aérea de lentisco, mirto, madroño, retama, romero y taray después de 2 meses de tratamiento con distintas dosis de As. Los datos fueron analizados por un ANOVA de 2 factores con interacción, la significación de los factores se resume al final de la tabla: n.s.= no significativo; *= significativo al 5%; **= al 1%; ***= al 0,1%.

	Dosis As (μM)				
	Control	5	50	250	500
<i>P. lentiscus</i>					
Parte aérea	$1,98 \pm 0,08$	$1,35 \pm 0,07$	$0,95 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,04$	-
Raíz	$1,20 \pm 0,07$	$0,98 \pm 0,06$	$0,88 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,04$	-
<i>M. communis</i>					
Parte aérea	$0,55 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,01$	-
Raíz	$0,57 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01$	-
<i>A. unedo</i>					
Parte aérea	$0,46 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,00$	-
Raíz	$0,56 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,03$	-
<i>R. sphaerocarpa</i>					
Parte aérea	$1,03 \pm 0,07$	$0,91 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,04$	$0,62 \pm 0,04$	-
Raíz	$1,42 \pm 0,07$	$1,36 \pm 0,07$	$1,37 \pm 0,08$	$1,06 \pm 0,10$	-
<i>R. officinalis</i>					
Parte aérea	$0,80 \pm 0,01$	$0,70 \pm 0,06$	$0,53 \pm 0,03$	-	-
Raíz	$0,83 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,07$	$0,47 \pm 0,03$	-	-
<i>T. gallica</i>					
Parte aérea	$1,43 \pm 0,03$	-	$0,93 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,04$
Raíz	$1,53 \pm 0,13$	-	$1,16 \pm 0,07$	$0,87 \pm 0,16$	$0,73 \pm 0,03$
ANOVA	[P]_{PA}	[P]_{raíz}			
Especie	***	***			
Tratamiento	***	***			
Esp*Tto	*	n.s.			

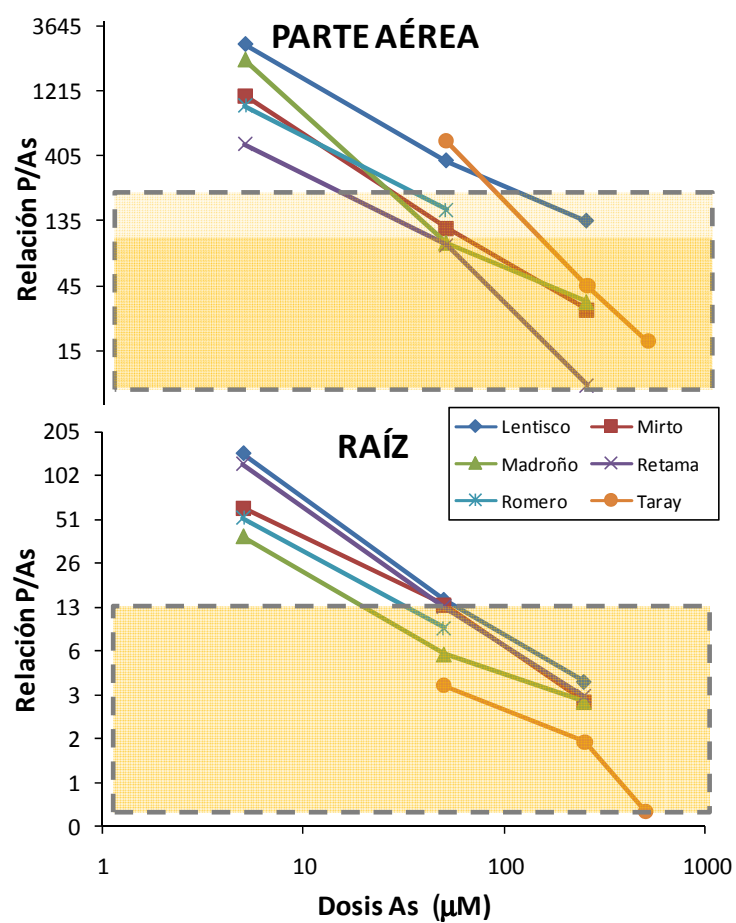


Figura 24. Relación molar P/As (media) en raíz y parte aérea de plantas arbustivas mediterráneas. Los ejes están en formato logarítmico: Log_{10} para el eje de abscisas; en los de de ordenadas, Log_2 para las raíces, y Log_5 para la parte aérea. La zona sombreada indica la zona crítica de la relación en la que se observan síntomas de estrés en la planta (inhibición del crecimiento o cambios en los bioindicadores).

Indicadores de estrés: clorofilas, tioles (-SH) y peroxidación de lípidos (MDA)

En todos los casos la concentración de clorofila *a* fue más sensible a la presencia de As en hojas que la clorofila *b*, por lo que fue la elegida como bioindicador (Tabla 16). El nivel de clorofila *a* en hojas se vió alterado en todas las especies vegetales por la dosis de As aplicada en la disolución nutritiva. Así, las dosis crecientes de arseniato provocaron una disminución de la concentración de clorofila *a*. El descenso más pronunciado se produjo en las hojas de madroño. En cambio los niveles en taray y retama fueron los menos afectados por las dosis más altas.

Tabla 16. Concentración de clorofila *a* (mg chl *a* g⁻¹ PF, media ± EE, *n*= 3-4) e incremento porcentual de clorofila *a* en relación a los controles (entre paréntesis,%) en hojas de especies arbustivas mediterráneas cultivadas con distintas dosis de As. Las letras diferentes implican diferencias significativas entre tratamientos (*P* < 0,05).

	Dosis As (μM)				
	Control	5	50	250	500
<i>P. lentiscus</i>	0,90 ± 0,01 d	0,83 ± 0,03 c (-8%)	0,75 ± 0,01 b (-17%)	0,67 ± 0,03 a (-26%)	-
<i>M. communis</i>	0,70 ± 0,01 b	0,77 ± 0,03 c (8%)	0,64 ± 0,02 b (-8%)	0,32 ± 0,02 a (-54%)	-
<i>A. unedo</i>	0,56 ± 0,01 d	0,53 ± 0,01 c (-5%)	0,34 ± 0,01 b (-32%)	0,30 ± 0,01 a (-37%)	-
<i>R. sphaerocarpa</i>	0,60 ± 0,03 c	0,55 ± 0,01 bc (-8%)	0,52 ± 0,01 b (-12%)	0,44 ± 0,02 a (-23%)	-
<i>R. officinalis</i>	0,62 ± 0,06 b	0,60 ± 0,01 b (-3%)	0,53 ± 0,02 a (-14%)	-	-
<i>T. gallica</i>	1,22 ± 0,07 c	-	1,11 ± 0,08 bc (-9%)	0,90 ± 0,03 ab (-26%)	0,86 ± 0,03 a (-30%)

La concentración de grupos –SH en planta aumentó en raíces y hojas de las plantas como regla general en respuesta a la acumulación progresiva de As (Tabla 17). Sin embargo, el aumento fue especialmente significativo en el caso de las raíces de madroño y mirto y de raíces y hojas de taray.

Tabla 17. Concentración de tioles (nmol -SH g⁻¹ PF, media ± EE, n= 3-4) e incremento porcentual de tioles en relación a los controles (entre paréntesis,%) en raíces y hojas de especies arbustivas mediterráneas cultivadas con distintas dosis de As. Las letras diferentes implican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

	Dosis As (μM)	Tioles	
		Raíz	Hojas
Lentisco	Control	79 ± 1 a	272 ± 3 a
	5	76 ± 2 a (-4%)	277 ± 11 a (2%)
	50	102 ± 10 b (29%)	271 ± 13 a (0%)
	250	115 ± 17 b (34%)	298 ± 19 a (10%)
Mirto	Control	51 ± 5 a	339 ± 26 a
	5	81 ± 11 b (61%)	343 ± 9 a (1%)
	50	109 ± 15 bc (113%)	395 ± 6 b (17%)
	250	125 ± 13 c (125%)	500 ± 15 b (47%)
Madroño	Control	111 ± 8 a	398 ± 5 a
	5	143 ± 10 b (29%)	442 ± 7 b (11%)
	50	141 ± 5 b (27%)	462 ± 3 b (16%)
	250	239 ± 10 c (115%)	465 ± 3 b (17%)
Retama	Control	50 ± 2 a	181 ± 4 a
	5	51 ± 2 a (2%)	206 ± 5 b (14%)
	50	61 ± 2 b (22%)	216 ± 5 a (19%)
	250	82 ± 6 b (64%)	277 ± 12 b (53%)
Romero	Control	81 ± 11 a	175 ± 23 a
	5	83 ± 9 a (2%)	203 ± 13 a (16%)
	50	122 ± 9 b (51%)	205 ± 13 a (17%)
Taray	Control	30 ± 6 a	101 ± 5 a
	50	58 ± 7 b (93%)	90 ± 10 a (-10%)
	250	73 ± 7 c (143%)	141 ± 11 b (40%)
	500	126 ± 6 c (320%)	173 ± 5 b (71%)

La concentración de malondialdehído (MDA) en tejidos vegetales es un indicador de la peroxidación de lípidos de membrana y el estrés oxidativo sufrido. Los niveles de MDA en raíces y hojas crecieron en respuesta a las concentraciones crecientes de As en la planta (Tabla 18). Mientras en retama las dosis 5 y 50 μM As no causaron incrementos significativos del MDA, en madroño y lentisco la dosis 5 μM fue suficiente para causar un incremento del estrés oxidativo.

Tabla 18. Concentración de MDA (nmol MDA g^{-1} PF, media \pm EE, $n=3-4$) e incremento porcentual de MDA en relación a los controles (entre paréntesis, %) en raíces y hojas de especies arbustivas mediterráneas cultivadas con distintas dosis de As. Las letras diferentes implican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

	Dosis As (μM)	MDA	
		Raíz	Hojas
Lentisco	Control	47,4 \pm 1,9 a	63,4 \pm 1,1 a
	5	47,9 \pm 1,5 ab (1%)	65,5 \pm 0,4 a (3%)
	50	55,5 \pm 2,3 b (17%)	72,5 \pm 2,4 b (14%)
	250	63,3 \pm 1,0 c (34%)	72,5 \pm 0,5 b (21%)
Mirto	Control	16,0 \pm 1,1 a	21,4 \pm 1,3 a
	5	16,8 \pm 1,7 a (4%)	21,7 \pm 1,4 a (0%)
	50	21,7 \pm 1,4 b (35%)	26,4 \pm 0,4 b (23%)
	250	25,1 \pm 1,2 c (56%)	25,0 \pm 0,7 b (17%)
Madroño	Control	4,9 \pm 0,3 a	10,0 \pm 0,5 a
	5	8,2 \pm 1,2 b (67%)	11,7 \pm 1,4 a (17%)
	50	9,2 \pm 0,8 bc (88%)	14,2 \pm 1,8 ab (42%)
	250	12,5 \pm 1,4 c (155%)	19,8 \pm 0,6 b (99%)
Retama	Control	23,9 \pm 0,5 a	24,7 \pm 0,5 a
	5	24,6 \pm 0,4 a (2%)	24,6 \pm 2,4 a (0%)
	50	24,4 \pm 1,1 a (1%)	24,5 \pm 2,1 a (0%)
	250	30,4 \pm 3,0 b (27%)	27,0 \pm 1,1 b (9%)
Romero	Control	18,8 \pm 0,4 a	19,4 \pm 0,9 a
	5	24,4 \pm 0,7 a (30%)	20,1 \pm 1,5 a (4%)
	50	27,7 \pm 1,1 b (47%)	22,6 \pm 0,2 b (16%)
Taray	Control	25,4 \pm 0,4 a	31,1 \pm 0,3 a
	50	30,7 \pm 0,4 b (21%)	32,5 \pm 0,3 a (5%)
	250	33,3 \pm 0,3 c (31%)	32,0 \pm 0,2 b (3%)
	500	33,4 \pm 0,3 c (31%)	34,8 \pm 0,7 b (12%)

Para evaluar la utilidad de los bioindicadores, se realizaron análisis de correlación lineal entre la concentración de As en el tejido y la de bioindicador, ya sea clorofila *a*, tioles o MDA (Tabla 19). Dichos análisis mostraron una fuerte correlación, superior a 0,5 en la mayoría de los casos. La alta significación de las correlaciones señala la relación significativa entre factores, siendo esta relación directamente proporcional en el caso de tioles o MDA con la concentración de As en mismo tejido, pero inversa en el caso de las clorofila *a*.

Tabla 19. Coeficientes de correlación (R^2) entre la concentración de As en los tejidos vegetales y la de bioindicadores ($***P < 0.001$; $**P < 0.01$; $*P < 0.05$, $n= 16-12$). Entre paréntesis se muestra el signo de la correlación. Los datos de As en raíz y hoja fueron transformados a base húmeda mediante el porcentaje de humedad. La correlación para el romero no fue evaluada por el bajo número de datos y tratamientos.

	Hoja			Raíz	
	[Chla] vs. [As]	[MDA] vs. [As]	[-SH] vs. [As]	[MDA] vs. [As]	[-SH] vs. [As]
Lentisco	(-) 0,76***	(+) 0,65***	n.s.	(+) 0,85***	(+) 0,79***
Mirto	(-) 0,83***	(+) 0,25*	(+) 0,85***	(+) 0,76***	(+) 0,64***
Madroño	(-) 0,84***	(+) 0,57***	(+) 0,53***	(+) 0,73***	(+) 0,53***
Retama	(-) 0,68***	(+) 0,52**	(+) 0,86***	n.s.	(+) 0,87***
Taray	(-) 0,61***	(+) 0,67***	(+) 0,84***	(+) 0,85*** ¹	(+) 0,79***

¹: Se han excluido los valores de la dosis 500 μM As, ya que se observa un comportamiento asintótico.

Retención en pared celular

Se extrajo pared celular de las raíces de plantas de lentisco (baja resistencia) y taray (alta resistencia) tratadas con 50 y 250 μM As y se analizó la concentración en dicha pared (Tabla 20). Los análisis preliminares indican que la retención de As en pared celular de raíz no es desdeñable: hasta un tercio (30-33%) del As se retuvo en las paredes para la dosis 50 μM As, aunque para la dosis 250 μM disminuyó ese porcentaje hasta un 14% para el taray y un 3% en el caso de lentisco. Este bajo porcentaje de As retenido en pared en lentisco afectado por 250 μM se corresponde con síntomas severos de toxicidad.

Tabla 20. Porcentaje de As retenido en la pared celular de raíces de lentisco y taray cultivados en dosis de As 50 y 250 μM . Media, $n= 3-4$.

	Dosis As (μM)	
	50	250
Taray	30,4%	14,1%
Lentisco	33,0%	3,4%

Discusión

Todas las especies estudiadas concentraron As en sus órganos proporcionalmente a la dosis añadida en la disolución nutritiva. Esta acumulación en los tejidos vegetales causó una inhibición del crecimiento que ya ha sido frecuentemente descrita para otras especies vegetales. Así, previamente se había comprobado en ensayos hidropónicos que las plantas de *Helianthus annuus*, *Oriza sativa*, *Lupinus albus*, *Holcus lanatus* o *Zea mays* vieron afectado su desarrollo vegetal (Abbas y Meharg, 2008; Hartley-Whitaker y col., 2001; Vázquez y col., 2005). El As es un elemento fitotóxico, por lo que dicho efecto sobre el crecimiento era esperable. Además aparecieron otros síntomas visuales para las dosis más altas (clorosis y necrosis foliar fundamentalmente). Aunque se ha estudiado mucho la toxicidad del As en especies cultivadas y agrícolas, existe una carencia de estudios de este tipo en la bibliografía, y todavía no se ha estudiado suficientemente el efecto del As sobre especies mediterráneas de interés en revegetación de suelos degradados. El incremento de biomasa de mirto con una dosis baja de As tampoco es un efecto aislado, ya que algunos autores han observado efectos parecidos en otras especies (Carbonell-Barrachina y col., 1998; Mascher y col., 2002). Como hasta la fecha no se ha descrito ninguna función biológica del As en células vegetales, se sugiere que dicho efecto podría estar relacionado con un incremento de la concentración de P en plantas que, como en nuestro ensayo, se ha observado en ocasiones asociado a dosis bajas de As (Carbonell-Barrachina y col., 1998).

Tanto la relación $[As]_{PA}/[As]_{raiz}$ como el porcentaje de As retenido en raíz apuntan al madroño como la especie que muestra un comportamiento excusor más marcado. A pesar de ello, todas las especies mostraron un comportamiento excusor porque acumularon la mayor parte del As absorbido de la disolución nutritiva en las raíces. De este modo, todas las especies ensayadas se comportan como la mayoría de las plantas. Así, plantas de guisante, altramuza, *H. lanatus*, nabo o trébol rojo acumularon hasta el 95% del As absorbido en raíces (Carbonell-Barrachina y col., 1999; Hartley-Whitaker y col., 2001; Päivöke y Simola, 2001; Mascher y col., 2002; Vázquez et al., 2005). El taray, la retama, el lentisco y el romero son las que mayor capacidad de translocar el As demostraron. Las limitaciones en la translocación de As provocan una baja relación $[As]_{PA}/[As]_{raiz}$ en las plantas estudiadas ($< 0,12$). También este dato es coherente con lo descrito para otras especies vegetales: $< 0,1$ en *Brassica juncea* y $< 0,03$ en altramuza, 0,03–0,09 en trigo, 0,03–0,07 en *Arabidopsis thaliana* y $< 0,02$ en tomate y arroz (Pickering y col., 2000; Vázquez et al., 2005; Geng et al., 2006). Solamente las plantas acumuladoras son capaces de translocar eficientemente As a la parte aérea, por ejemplo, en *Pteris vittata* el 90% del As alcanza la parte aérea (Zhang y col., 2002), con unos ratios $[As]_{PA}/[As]_{raiz}$ obviamente muy superiores a los observados en otras especies vegetales. Aunque los datos en este estudio son aun preliminares, parece que la fracción de As retenida en la pared celular de las raíces (Tabla 20) no es tan desdeñable como cabía esperar de su condición aniónica. Quizá en ello influya la presencia de cationes que actúen como puentes entre las superficies cargadas negativamente del anión y de la pared, como sucede en el caso del fosfato (Clarkson y col., 1967), o incluso la presencia de Fe^{3+} , que precipite el As como arseniato férrico (Douceff y Terry, 2002) en el apoplasto de la raíz.

Teniendo en cuenta las condiciones del ensayo, con una buena aireación y a pH 6,5, y después de modelizar la disolución nutritiva con V-MINTEQ, podemos asegurar que la especie mayoritaria (>75%) de As en disolución fue arseniato monoprotonado (HAsO_4^{2-}). Tanto la absorción del arseniato como su toxicidad y su acumulación en la planta son dependientes de la dinámica de su análogo en la planta, el fosfato. Como mencionamos en la introducción, la absorción arseniato se produce a través de los transportadores de fósforo en la raíz, causando un descenso en el nivel vegetal de P (Meharg y Macnair, 1992; Esteban y col., 2003). Se ha descrito un descenso de los niveles de P en planta causados por el aporte de As a la disolución nutritiva en guisante y altramuz (Päivöke y Simola, 2001; Vázquez et al., 2005). Del mismo modo, en todas las especies ensayadas las dosis mayores de 50 μM de As causaron descensos de la cantidad de P en los tejidos vegetales. Existen evidencias de que la presencia de As reprime los genes implicados en la absorción de P inorgánico, lo que podría explicar parcialmente esta disminución de la concentración de P en tejidos vegetales (Catarcha y col., 2007). Paralelamente a dicha inhibición, se activan otros genes y rutas metabólicas implicadas en la detoxificación de As (Verbruggen y col., 2009). La sensibilidad de los tejidos vegetales al arseniato está también íntimamente relacionada con los niveles de P, lo que puede explicarse por la sustitución parcial del fosfato por arseniato en procesos bioquímicos celulares. Así la relación P/As es un buen indicador de los efectos del As en las plantas, y por ejemplo, para el hiperacumulador *P. vittata* valores menores de 1 son críticos (Tu y Ma, 2005). Sin embargo, para las especies mediterráneas arbustivas estudiadas los valores críticos parecen ser sustancialmente más elevados (Figura 24): < 15 en raíces y < 90-150 en parte aérea se tradujeron en descensos del crecimiento y las clorofilas, o incrementos del estrés oxidativo. De acuerdo con nuestros resultados, en plantas de altramuz, *Brassica napus* o guisante valores de la relación P/As mucho mayores de 1 también se asociaron con toxicidad por arseniato (Cox y Kovar, 2001; Päivöke y Simola, 2001; Vázquez et al., 2005). En ensayos sobre suelos con As añadido Christophersen y col. (2009) encontraron síntomas de toxicidad causada por As en *Medicago truncatula* asociadas a valores del ratio < 20 para la planta completa. Todo ello sugiere que aquel valor de 1 sería solo útil para plantas hiperacumuladoras.

Los niveles crecientes de As en la disolución nutritiva causaron efectos sobre los bioindicadores estudiados: disminuyeron los niveles de clorofila a, y aumentaron los tioles y el nivel de MDA en las plantas. El aumento de tioles es un mecanismo conocido de detoxificación de elementos traza en planta. En el caso de presencia de As se ha determinado un incremento del contenido de -SH en plantas de *H. lanatus* y altramuz. El As puede ser complejoado por fitoquelatinas (PCs) y glutatión (GSH) (Schmöger y col., 2000; Pickering y col., 2000; Vázquez et al., 2005). A pesar del incremento de tioles en los arbustos mediterráneos, el mecanismo de detoxificación no fue completamente efectivo, produciéndose estrés oxidativo y afección del nivel de clorofilas. El As induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tejidos vegetales (Hartley-Whitaker y col., 2001; Mascher y col., 2002; Srivastava y col., 2005), aunque las plantas son también capaces de luchar contra estos efectos mediante la activación de sistemas enzimáticos antioxidantes. Las especies estudiadas mostraron incremento de los niveles de MDA, lo que indica un aumento del estrés oxidativo. Por otro lado el descenso de clorofilas observado en las plantas

estaría en consonancia con lo observado para otras especies (Maschner y col., 2002), debido a la inhibición de la biosíntesis del pigmento (Jain y Gadre, 1997). Las correlaciones observadas (Tabla 19) entre el nivel de As y los bioindicadores corroboran su utilidad en la diagnosis de la toxicidad del As en raíces y hojas vegetales. Desde el punto de vista de la fisiología de la planta los bioindicadores analizados en este estudio hidropónico permiten obtener resultados útiles, ya que las dosis ensayadas provocan cambios bajo condiciones controladas. Sin embargo, su utilidad en condiciones de campo podría verse limitada frecuentemente por la baja disponibilidad del arseniato en suelos (Capítulo 7 y 8). Las dosis ensayadas en hidroponía exceden frecuentemente la concentración de As disponible en suelos, por lo que los cambios en dichos indicadores podrían no ser observables bajo condiciones de campo (Fitz y Wenzel, 2002), siendo los resultados difícilmente extrapolables de un sistema a otro.

Los parámetros de EC_{50} muestran como las raíces en general se vieron más afectadas que las partes aéreas de las distintas especies. Así, el valor para la raíz fue siempre menor. Del mismo modo, los incrementos porcentuales de los tratamientos respecto al control en MDA y -SH, apuntan que los síntomas de toxicidad de As en especies arbustivas mediterráneas son más acusados en la raíz. Aunque este hecho ha sido descrito también en estas especies vegetales (Carbonell-Barrachina y col., 1999; Abedin y Meharg, 2002; Vázquez et al., 2005), existen también evidencias de que algunas plantas muestran mayor toxicidad en la parte aérea (Requejo, 2004).

Teniendo en cuenta los datos de EC_{50} , los aumentos relativos respecto al control de las concentraciones de MDA y -SH y la menor disminución de clorofilas, pueden identificarse tanto retama como taray como las especies más resistentes a la presencia y absorción de As. En general ambas especies muestran también una alta relación P/As. Mientras, romero y madroño parecen las más sensibles al As en base a los mismos parámetros.

El uso de estas especies en revegetación de suelos contaminados por As puede ser una interesante alternativa en la zona mediterránea. Todas las especies parecen resistir en mayor o menor medida las dosis de arseniato que suele haber en la solución del suelo ($< 3 \mu\text{M}$, incluso en suelos contaminados). Estas especies están adaptadas a las condiciones ambientales que se dan en la zona mediterránea, especiales en agua y temperatura. Siendo sostenibles en los suelos de dicha zona, estas plantas pueden ayudar a la sucesión ecológica y al establecimiento de nuevas especies vegetales y animales (Singh y col., 2002). Aunque ninguna de ellas es hiperacumuladora, la formación de una cubierta vegetal dificulta la dispersión del contaminante (Robinson y col., 2006) y las plantas acumulan parte del As disponible en sus tejidos, por lo que cabría esperar cierto grado de fitoestabilización. Algunas tienen características que las hacen interesantes, p. ej., la retama es una planta leguminosa que con su resistencia al As y la capacidad de aumentar la actividad microbiana del suelo (García y col., 2005), puede crear “islas de fertilidad” donde pueden establecerse otras especies (Valladares y col., 2002); el lentisco, por otra parte, es una especie capaz de generar nichos ecológicos susceptibles para la reintroducción de especies de interés para la cadena trófica como el conejo europeo (Fa y col., 1999). El taray es una especie capaz de acumular importantes cantidades de As cuando su disponibilidad es elevada, aunque a moderadas

concentraciones de As en la disolución nutritiva no fue mucho más efectivo que otras especies. Sin embargo es la que más porcentaje de translocación mostró, lo que podría limitar su uso en fitoestabilización. Si aplicamos estas especies para estrategias de fitorrecuperación, debemos tener en cuenta que la mayor parte de As inactivado por la planta se encontrará en la raíz. Sin embargo las raíces vegetales mueren y pueden ser degradadas, lo que puede producir una removilización del As estabilizado a largo plazo (Mench y col., 2010).

5. IMPACTO DE LA MINERALIZACIÓN DE RAÍCES EN LA DISPONIBILIDAD DE ARSÉNICO EN SUELOS. IMPLICACIONES EN FITOESTABILIZACIÓN DE SUELOS UTILIZANDO ESPECIES ARBUSTIVAS MEDITERRÁNEAS.

Objetivo: Evaluar el impacto a largo plazo de la fitoestabilización mediante el estudio de la liberación y redistribución del As durante la mineralización de las raíces vegetales.

Materiales y Métodos

Material vegetal y suelo utilizados

Se utilizaron raíces de *Arbutus unedo*, *Myrtus comunnis*, *Pistacea lentiscus*, *Retama sphaerocarpa*, *Rosmarinus officinalis* y *Tamarix gallica* obtenidas en el Capítulo 4. Las raíces lavadas y secas (60 °C durante 3 días) se molieron y tamizaron finamente (<0,5 mm) para este ensayo. Se realizó una caracterización inicial del material vegetal: el N total y el C orgánico se determinaron con un microanalizador automático EuroVector (EuroVector, Milan, Italia; Clemente et al., 2008) en el CEBAS-CSIC (Murcia); el análisis elemental se realizó mediante la digestión de la muestra en medio nítrico oxidante en autoclave como describe Lozano-Rodríguez y col. (1995) y se determinaron metales (espectroscopía de absorción atómica, EAA), arsénico (fluorescencia atómica) y fósforo (colorimetría con reactivo Duval).

Se utilizó un suelo ligeramente ácido (pH = 5,5), procedente de Aznacóllar (Sevilla, 37° 26' 21" N 06° 13' 00" W), de la parcela experimental "El Vicario" y afectado por el vertido de lodo minero. Los primeros 20 cm de suelo se recogieron, se secaron durante una semana y se tamizaron a <2 mm. La caracterización del suelo (pH, conductividad, textura, materia orgánica, contenido en carbonatos) se realizó siguiendo los métodos oficiales del Ministerio de Agricultura (MAPA, 1994). El suelo es un Typic Xerofluvent (Vázquez y col., 2006a), con una textura franca (43% arena; 38% limo; 19% arcilla), una conductividad de 0,665 dS m⁻¹ y un contenido de CaCO₃ <0,1%. La capacidad de amortiguación del suelo (40 me kg⁻¹) se determinó como mEq kg⁻¹ de OH⁻ necesarios para aumentar el pH en una unidad (Hartikainen, 1986). Después de una digestión de 0,5 g de suelo en autoclave con HNO₃:H₂O₂ durante 30 min a 125 °C y 1,5 kPa (Capítulo 3), la concentración de metales, As y P total en suelo se determinó por EAA, fluorescencia atómica o espectrofotometría (Tabla 21).

Tabla 21. Caracterización de raíces y suelos: carbono orgánico, nitrógeno total y concentración total de algunos elementos.

	C _{orgánico} (%)	N _{tot} (%)	Concentración total (mg kg ⁻¹)				
			As	P	Cu	Zn	Fe
Suelo	1,29	0,07	80,8	404	105	302	2,55*
Raíces							
<i>Tamarix gallica</i>	43,7	1,52	267	1004	15,3	19,4	390
<i>Myrtus communis</i>	46,1	1,25	147	812	22,1	39,5	354
<i>Arbutus unedo</i>	44,9	0,95	192	710	15,7	7,3	628
<i>Pistacea lentiscus</i>	44,0	1,10	120	731	16,9	20,9	389
<i>Retama sphaerocarpa</i>	45,6	1,53	74,3	1179	21,1	17,9	168
<i>Rosmarinus officinalis</i>	47,8	1,11	89,3	596	17,4	64,4	236

*La concentración de Fe en suelo se muestra en‰.

Experimento de incubación

Los suelos control (100 g) y los suelos con tejidos de raíz (100 g de suelo con 1 g de raíces cargadas de As) se situaron en contenedores de plástico abiertos, dentro de otro contenedor de 1,8 L que cerraba herméticamente y que contenía agua en el fondo para evitar el secado del suelo (Figura 25). La proporción raíz:suelo de 1% se estimó a partir del trabajo de Martínez-Alcalá y col. (2009). Se añadió agua mili-Q cuando fue necesario para mantener los suelos al 60% de su capacidad de retención hídrica. Se utilizaron tres replicados para cada tratamiento que se abrieron una vez a la semana para mantener el nivel de O₂. La incubación se realizó en una incubadora bajo condiciones de oscuridad a 26 °C. Los suelos se muestrearon a los 3, 7, 14, 28, 42 y 56 días. La fracción de As y metales disponibles se extrajo con (NH₄)₂SO₄ (Capítulo 3): 2 g de suelo se agitaron (a 180 rpm) con 20 mL de (NH₄)₂SO₄ 0,1 M, a 20 °C durante 4 h (Vázquez y col., 2008a). Las muestras se filtraron antes de determinar la concentración de As, P y metales. La conductividad eléctrica (en suspensión 1:5 con agua) y el pH (1:2.5) también se analizaron.

La degradación de los tejidos radiculares se determinó monitorizando la mineralización de las raíces en un conjunto de incubaciones usando vasos con 10 g de suelo o suelo+raíz. El CO₂ desprendido durante la incubación se atrapó en 10 mL de NaOH 0,1 M situados en tubos dentro del vaso de incubación. Como blanco se usaron tres vasos vacíos. La incubación en vasos se cerró herméticamente, pero se abrían periódicamente para mantener adecuados niveles de O₂. El CO₂ se determinó semanalmente, después de 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días, mediante la valoración de la solución de NaOH con HCl 0,1 M con un exceso de BaCl₂. La mineralización del carbono de las raíces se expresó como porcentaje del carbono desprendido como CO₂ respecto al C total medido en la misma raíz (Clemente y col., 2006a).

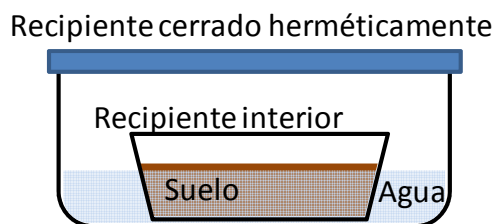


Figura 25. Esquema de los contenedores de incubación.

Tratamiento estadístico de los datos

Se usó el paquete estadístico SPSS 14.0 para Windows para analizar las diferencias significativas entre tratamientos mediante análisis de varianza, seguido de un test post-hoc de Tukey para comparar las medias. También se determinó la correlación entre elementos en suelo y pH.

Los datos de mineralización se ajustaron a una función exponencial decreciente de primer orden mediante el algoritmo de Marquardt-Levenberg, usando el programa Sigma-Plot: $C_m = C_0(1 - e^{-kt})$, donde C_m es el C mineralizado (% de COT) al tiempo t (días), C_0 es el C potencialmente mineralizable (% de COT) y k es la tasa de mineralización (día^{-1}). La bondad del ajuste se estimó por el residuo de las medias al cuadrado y el valor F de la ANOVA.

Resultados

Degradación de las raíces vegetales en el suelo

Después de 56 días de incubación, se desprendieron de los suelos control $532 \pm 79 \mu\text{g C g}^{-1}$, mientras que se detectaron valores mayores en todos los tiestos con raíces, creciendo en este orden ($\mu\text{g C g}^{-1}$): 1172 ± 29 para romero < 1424 ± 26 para taray < 1604 ± 30 para mirto ~ 1620 ± 48 para madroño < 1864 ± 41 para lentisco < 2345 ± 64 para retama.

La degradación de las raíces se calculó usando las diferencias entre el suelo control y cada suelo con raíz. Tras 56 días de incubación el C mineralizado se encontró en el rango 13-40% y mostró diferencias significativas entre especies ($P < 0,001$), observando el valor más alto de C_m para retama y el más bajo para romero (Tabla 22). La dinámica de mineralización siguió una función cinética de primer orden (Figura 26) y las curvas se ajustaron todas con una significación de $P < 0,001$ (Tabla 22). Los parámetros de las curvas mostraron que el C potencialmente mineralizable (C_0) fue mayor para retama y menor para romero, con el mismo patrón por tanto que el C_m (Tabla 22).

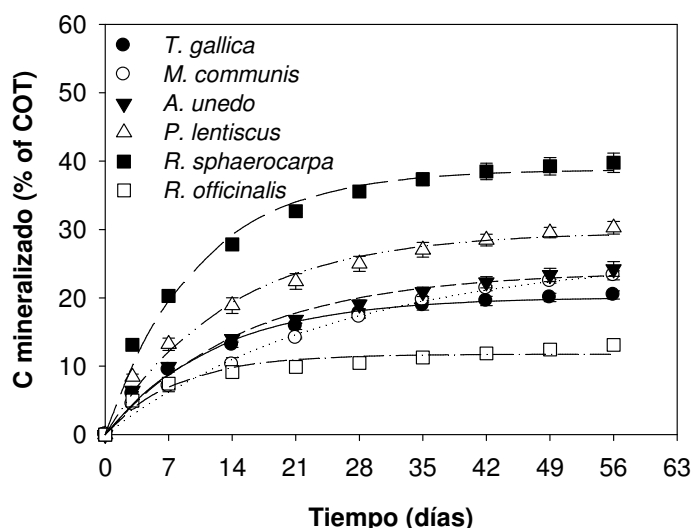


Figura 26. Mineralización del carbono como porcentaje respecto al total añadido con las raíces. COT: carbono orgánico total. Media \pm EE, $n = 3$; las líneas son las curvas de ajuste.

Tabla 22. Porcentaje de COT mineralizado para las raíces después de 56 días de incubación en los suelos (C_m), y parámetros calculados a partir del modelo cinético de primer orden $C_m = C_0(1 - e^{-kt})$, C potencialmente mineralizable (C_0), constante (k) y estadísticos: media residual al cuadrado (RMS) y factor F del ANOVA. Media \pm EE ($n = 3$).

Especie	C_m (% COT)	C_0 (% COT)	k (día ⁻¹)	RMS	F
<i>T. gallica</i>	20,4 \pm 0,59	20,1 \pm 0,45	0,082 \pm 0,0066	0,522	820 ***
<i>M. communis</i>	23,3 \pm 0,65	26,4 \pm 1,18	0,039 \pm 0,0037	0,515	1162 ***
<i>A. unedo</i>	24,2 \pm 1,08	23,9 \pm 0,88	0,065 \pm 0,0073	1,215	471 ***
<i>P. lentiscus</i>	30,3 \pm 0,92	29,7 \pm 0,82	0,075 \pm 0,0070	1,442	635 ***
<i>R. sphaerocarpa</i>	39,7 \pm 1,41	38,8 \pm 0,78	0,100 \pm 0,0080	2,076	764 ***
<i>R. officinalis</i>	13,1 \pm 0,14	11,8 \pm 0,44	0,128 \pm 0,0213	0,849	162 ***

Efectos de la degradación de la raíz sobre el pH y la concentración de As, P, Cu y Zn disponibles en suelo

Los factores tratamiento, tiempo de incubación y su interacción afectaron significativamente al pH del suelo ($P < 0,001$). La presencia de la raíz vegetal en el suelo aumentó el pH durante todo periodo que duró la incubación al comparar los tratamientos con el suelo control (Figura 27). El mayor pH se encontró en el tratamiento con raíces de retama, mientras los menores cambios se observaron en aquellos con raíces de taray y mirto. En todos los tratamientos, el pH decreció a lo largo del tiempo entre 0,23 y 0,34 unidades, indicando la baja capacidad para amortiguar cambios de pH en estos suelos debido a su carácter moderadamente ácido y su bajo contenido en carbonatos ($< 0,1\%$).

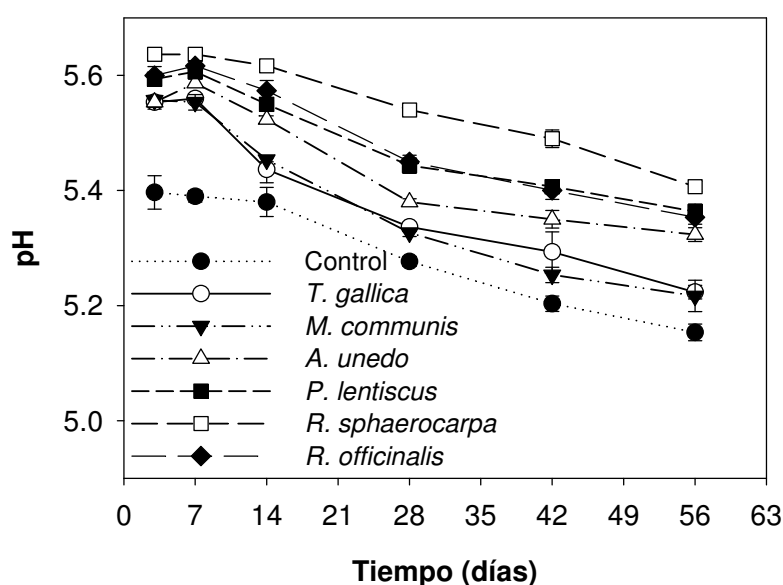


Figura 27. Evolución del pH del suelo durante la incubación después de aplicar distintos tratamientos de raíces. Media \pm EE ($n = 3$).

Se observaron diferencias significativas ($P < 0,001$) causadas por el tratamiento, el tiempo y su interacción en el As extraíble con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 28a). La presencia de raíces cargadas con As incrementó significativamente el As disponible tras 3 días de incubación ($P < 0,05$), excepto en el caso de las raíces de romero. Los mayores valores durante la incubación se encontraron en los suelos con raíces de taray y madroño. El As extraíble creció rápidamente por la mineralización de las raíces cargadas de As, para el primer muestreo aumentó entre 53 y 270% para los suelos con raíces de romero y taray respectivamente. Las diferencias entre suelo control y suelos con raíces disminuyeron a lo largo del tiempo, aunque siempre fueron mayores los valores para los suelos tratados. Al final de la incubación (día 56), solamente el tratamiento al que se añadieron raíces de taray tenía valores significativamente mayores de As disponible ($P < 0,05$). El P extraíble con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se determinó debido a las implicaciones edafológicas y nutricionales consecuencia de la analogía fosfato-arseniato (Figura 28b). El análisis de varianza mostró también diferencias significativas debidas al tratamiento, el tiempo o su interacción ($P < 0,001$). El P extraíble creció en todos los tratamientos con raíz ($P < 0,05$), excepto en el caso del romero, siendo las raíces de retama y lentisco las que produjeron mayores valores. Tras 56 días de incubación, los tratamientos con raíces de romero, taray, madroño y mirto no mostraron diferencias significativas con el control ($P > 0,05$).

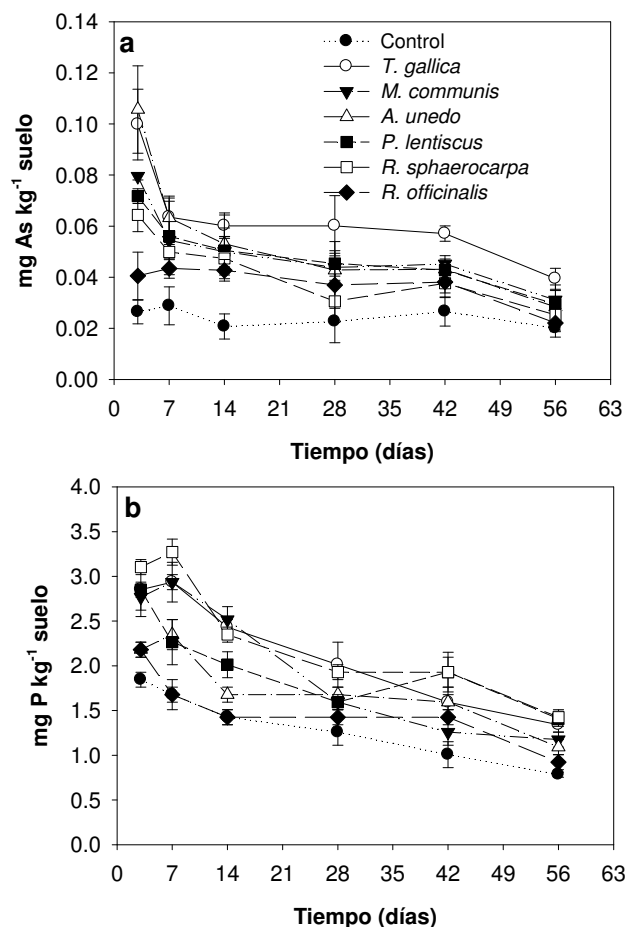


Figura 28. As (a) y P (b) extraíbles por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M en suelo control y en suelos con diferentes tipos de raíces. Media \pm EE ($n = 3$).

Con el objetivo de comparar la dinámica del As (contaminante aniónico) con otros contaminantes catiónicos, se determinaron Cu y Zn en los extractos de sulfato amónico (Figura 29a-b). Ambos elementos se vieron afectados por el tratamiento, el tiempo ($P < 0,001$) y su interacción ($P < 0,001$ para Zn y $P < 0,05$ para Cu). El cobre extraíble aumentó notablemente por la presencia de raíces al principio de la incubación ($P < 0,05$) si lo comparamos con el suelo control, excepto en el caso de las raíces de madroño. Después de 56 días, solamente se observó un aumento significativo para el caso del mirto ($P < 0,05$). El comportamiento del Zn fue diferente al del Cu. La concentración de Zn extraíble aumenta a lo largo del experimento para todos los tratamientos, siendo mayor la concentración de Zn en el suelo sin aporte de raíces ($P < 0,05$).

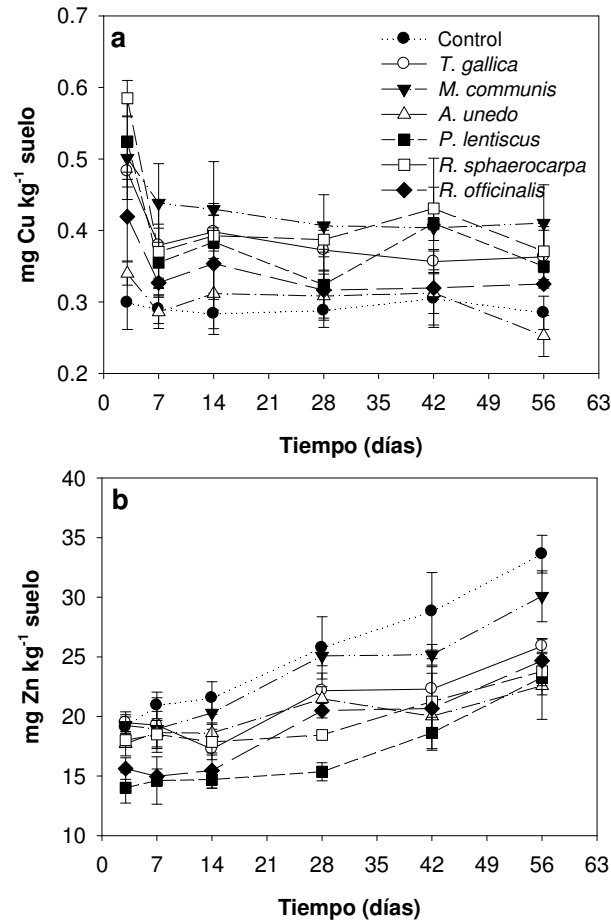


Figura 29. Cu (a) y Zn (b) extraíbles por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M en suelo control y en suelos con diferentes tipos de raíces. Media \pm EE ($n = 3$).

También se calcularon los coeficientes de correlación entre el arsénico, pH y elementos extraíbles. El As se correlacionó positivamente con P ($r = 0,70^{***}$), pH ($r = 0,53^{***}$) y Cu ($r = 0,51^{***}$), pero lo hizo negativamente con el Zn ($r = -0,43^{**}$). El Zn correlacionó fuerte y negativamente con el pH del suelo ($r = -0,86^{***}$), mientras el P correlacionó positivamente con el pH ($r = 0,77^{***}$). La correlación Cu-pH fue débil ($r = 0,39^*$).

Para interpretar los resultados se estimó el aporte de contaminantes atribuible a la presencia de raíces en el suelo, teniendo en cuenta la mineralización (C_0 , Tabla 22), y la concentración inicial de elementos en la raíz, de acuerdo con lo descrito en Vázquez y col. (2008c). Todas las especies mostraron importantes aportes de As en relación con el As extraíble con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ del suelo al principio de la incubación (Tabla 23). Esto es debido a la carga de As de las raíces durante el cultivo hidropónico (Tabla 21). Los aportes de P fueron menos importantes, y los de Zn y Cu fueron mucho más bajos que la fracción extraíble inicialmente.

Tras 3 días de incubación, el aporte de As (considerando solamente el C mineralizado a los 3 días) se situó entre 0,160 mg As kg^{-1} para las raíces de taray y 0,045 mg As kg^{-1} para las de romero. Todos los valores calculados de este modo fueron mayores que el incremento analizado en el As extraíble con sulfato

amónico en el suelo con las raíces (Figura 28a). Por tanto, sólomente una fracción del As liberado desde las raíces durante la degradación microbiana permanece como fácilmente extraíble en suelo. Esta fracción fue mayor para las raíces de mirto (81%), seguido por las de madroño (64%) y similares valores se obtuvieron para las otras especies (32%-46%).

Tabla 23. Concentración de As, Cu, Zn y P extraíbles en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el suelo al inicio del experimento y los aportes estimados de ellos debido a la presencia del 1% de raíces en el suelo y su mineralización después de 56 días de incubación.

	As	Cu	Zn	P
Concentración inicial de elemento extraíble en suelo (mg kg^{-1})	0,018	0,279	21,1	1,876
Aporte de elementos debidos a la raíz (mg kg^{-1})				
<i>Tamarix gallica</i>	0,537	0,039	0,031	2,018
<i>Myrtus communis</i>	0,388	0,104	0,058	2,144
<i>Arbutus unedo</i>	0,471	0,017	0,038	1,697
<i>Pistacea lentiscus</i>	0,356	0,062	0,050	2,171
<i>Retama sphaerocarpa</i>	0,288	0,069	0,082	4,575
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,105	0,076	0,020	0,703

Discusión

Durante el experimento se produjo un aumento de $\text{CO}_2\text{-C}$ liberado como consecuencia de la presencia de raíces en el suelo, confirmando la degradación de dicho material radicular. La mineralización siguió una función decreciente de primer orden, indicando que la tasa de mineralización disminuyó a lo largo de la incubación por la disminución de sustrato degradable. Esto indicaría que la población microbiana en los suelos de Aznalcóllar era suficientemente numerosa para degradar la fracción fácilmente degradable de las raíces, como ya habían observado anteriormente Vázquez y col. (2008c). Las diferencias en la mineralización del C de la raíz entre las especies estudiadas pueden deberse a diferencias en la composición del tejido radicular. Esta mineralización del C fue tres veces más intensa para la retama que para el romero. Este hecho podría afectar a la liberación de As y otros elementos desde la raíz al suelo. Entre el 13 y el 40% del C de la raíz se mineraliza durante los 56 días de incubación, valores similares a los observados para las raíces de altramuza o purines animales en similares experimentos (Vázquez y col., 2008c; Clemente y col., 2006a). Sin embargo, las raíces de especies arbustivas se mineralizaron en menor medida que otros materiales vegetales (Jensen, 1994; Frazluebuebbbers y col., 1994; Kirchmann y Bergvist, 1989) debido posiblemente a su mayor contenido en ligninas (Kirchmann y Bergvist, 1989). Las raíces de romero fueron claramente las más resistentes a la degradación.

Los suelos de Aznalcóllar tienen una baja capacidad amortiguadora de pH (Domenech y col., 2002); por esta razón los cambios en el pH se observaron claramente tras la aplicación de raíces y durante la mineralización de la materia orgánica. El pH de los suelos suele modificarse tras la aplicación de materiales orgánicos al suelo, principalmente en aquellas enmiendas utilizadas en suelos agrícolas (Clemente y col., 2006a). En nuestro caso, las diferencias causadas sobre el pH del suelo al aplicar raíces indican que la presencia de material vegetal es un factor importante que controla el pH, y, a su vez, el pH es un factor que controla la movilidad de los elementos traza en los suelos (Adriano, 2001). En todas las incubaciones se produjo un descenso del pH a lo largo del tiempo. En los suelos recogidos para el experimento es probable que queden algunos restos de sulfuros asociados con la contaminación derivada del vertido minero de Aznalcóllar (Domenech y col., 2002). La oxidación del azufre es altamente dependiente de factores como la humedad del suelo, el tamaño de partícula o la aireación (Germida y Janzen, 1993; de la Fuente y col., 2008). En el experimento realizado, las condiciones son idóneas para que se produzca la oxidación del azufre catalizada por los microorganismos, lo que genera protones que pueden acidificar progresivamente los suelos, sobre todo en este caso en que el suelo tiene una capacidad de amortiguación baja. En el ambiente del suelo, el As se presenta normalmente en forma inorgánica, siendo la especie de arseniato diprotonado (H_2AsO_4^-) la especie probablemente predominante a las condiciones de pH (5,1-5,7) y potencial red-ox (Eh 200-400 mV) que se desarrolló el experimento (Srivastava y col., 2007).

Se observó una rápida redistribución del As en el suelo tras la aplicación de raíces. Inicialmente, el arsénico es liberado de las raíces como extraíble, pero luego probablemente interacciona con la fracción coloidal del suelo (óxidos, arcillas, etc), siendo retenido y reduciéndose su solubilidad (Sadiq, 1997). El pH del suelo también disminuye durante la incubación, y muchos autores han descrito una reducción de la disponibilidad del As cuando el pH del suelo decrece como consecuencia del aumento de las superficies de retención de arseniato (Fitz y Wenzel, 2002). Así, existirían 3 factores actuando en el descenso de la solubilidad del As: la disminución de la tasa de degradación, la interacción con los componentes del suelo y el descenso del pH. La especie vegetal es otro factor clave que controla la liberación de As durante la mineralización. Las raíces de taray mostraron la mayor carga de As y aunque su degradabilidad fue baja, el alto aporte ocasionó las mayores concentraciones de As disponible en suelo. Lo contrario se observó para las raíces de romero, que mostraron la menor concentración de As, la menor degradabilidad y, por tanto, el menor aporte, ocasionando el menor incremento de As disponible. En consecuencia, las diferencias del As extraíble a lo largo del tiempo para cada especie pueden ser parcialmente explicadas por el aporte realizado al suelo.

Sin embargo no todo el As liberado de las raíces acaba en el suelo en una forma disponible. Así, las raíces de mirto y madroño parece que habían acumulado el As en una forma más fácilmente solubilizable que otras especies, porque la mayor parte del As liberado de las raíces permaneció como extraíble. La acumulación y compartimentación de As en los tejidos vegetales difiere claramente entre especies. En algunas el As es detoxificado en gran proporción mediante la quelación por complejos tiólicos,

como en *Heliantus annuus*, *Lupinus albus* e *Hydrilla verticillata* (Raab y col., 2005; Vázquez y col., 2005; Srivastava y col., 2007), mientras que se ha descrito una baja proporción en otras especies como *Holcus lanatus*, *Pteris cretica* y *Pteris vittata* (Zhao y col., 2002; Raab y col., 2004). Las poblaciones hipertolerantes y las especies hiperacumuladoras de hongos y plantas pueden acumular de manera efectiva el As en el interior de la vacuola (Pickering y col., 2006; Canovas y de Lorenzo., 2007), pero también la pared celular puede retener algo de As (Douceff y Terry, 2002). Las estrategias de acumulación de As en plantas dependen de la especie vegetal, por lo que su liberación al suelo durante la degradación de tejidos vegetales dependerá también de la forma de acumularlo. Existieron diferencias también en los cambios de pH producidos por la aplicación de raíces al suelo debidos a la especie, y el As disponible y el pH se correlacionaron de forma moderada. En otro experimento similar usando raíces de altramuiz en suelos con pH muy distintos (entre 2 y 8) el pH fue el principal factor que condicionó la movilidad de los elementos traza tras la aplicación de la raíz (Vázquez y col., 2008c). En comparación con dichas raíces de altramuiz, las raíces de especies arbustivas mediterráneas incrementaron la disponibilidad de As en menor magnitud, lo que apoya el uso potencial de estas especies en la restauración ecológica de zonas mediterráneas con As (Capítulo 4). Conjuntamente, el P del suelo puede alterar la dinámica del As en el sistema suelo-planta. Debido al aporte del material radicular, los niveles de fosfato en los extractos de suelo se incrementaron, y se obtuvo una alta correlación entre P y As disponible. El aumento inducido por la aplicación de raíz en el pH puede también favorecer la movilidad del P en suelos y por ello se observó una alta correlación positiva pH-P. Todo este incremento del P disponible puede ayudar a disminuir el riesgo asociado al arseniato soluble, ya que puede disminuir la absorción del contaminante por las plantas, aunque se movilizaría en el suelo por la competencia fosfato-arseniató por los lugares de retención (Fitz y Wenzel, 2002).

Si consideramos los metales, el Cu disponible claramente aumenta, hecho que no puede ser explicado únicamente por el aporte que supone la presencia de la raíz. Por tanto, el Cu presente en el suelo debe ser quelado y movilizado por algún compuesto soluble liberado durante la mineralización de las raíces, lo que lo redistribuye hacia las fracciones más solubles. Un efecto similar al que describimos se observó en un estudio en el que tras la aplicación de purín al suelo se movilizó el Cu (Clemente y col., 2006a). La moderada correlación Cu-As disponibles podría ser explicada porque los cambios en la dinámica de ambos elementos dependen de la mineralización de la raíz. Sin embargo la solubilidad del Zn disminuyó al aplicar las raíces al suelo, y se observó una fuerte correlación negativa entre la disponibilidad del Zn y el pH. Es de sobra conocida esta fuerte influencia del aumento del pH sobre la disponibilidad del Zn en suelos (Ross, 1994; Arias y col., 2005).

Este estudio ha usado raíces molidas a un tamaño pequeño (< 0,5 mm) y se han mantenido unas condiciones de aireación, humedad y temperatura óptimas para la actividad microbiológica. Así podríamos decir que se ha ensayado el peor escenario posible. Bajo estas condiciones se espera una tasa de mineralización más intensa que bajo condiciones reales de campo, en las que la raíz estaría intacta y las condiciones ambientales probablemente no serían tan favorables para la degradación microbiana del tejido vegetal.

En el experimento, la dinámica del As en el suelo ligeramente ácido estuvo controlada por el aporte que supuso la aplicación de la raíz de cada especie al suelo testado, que dependió de la especie y de la tasa de mineralización de cada raíz. Así las especies con una alta concentración de As en sus raíces y con una tasa alta de mineralización liberarán mayor cantidad de As al suelo en formas solubles. Sin embargo el suelo no permanece inerte ante este fenómeno y el As puede ser parcialmente retenido. Además, el incremento de P soluble asociado a la mineralización de las raíces puede paliar los efectos tóxicos del As en las plantas.

En relación con las perspectivas exitosas de usar fitotecnologías en terrenos contaminados por As (p. ej., fitoestabilización), se puede concluir que el riesgo de la removilización de As durante la muerte y descomposición radicular es bajo, apoyando la utilidad de estas técnicas. Las raíces de plantas arbustivas mediterráneas aumentaron en menor medida el As disponible que las de altramuza, por lo que son más adecuadas para fitoestabilización a largo plazo. Cabe destacar también que las plantas perennes tienen la ventaja, con respecto a las anuales, de que su presencia es de más larga duración y, por tanto, el riesgo de removilización del contaminante desde las raíces muertas de la planta es menos frecuente.

6. ENSAYO DE FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR LODOS PIRÍTICOS CON ESPECIES ARBUSTIVAS MEDITERRÁNEAS. EFECTOS SOBRE LA CALIDAD DEL SUELO.

Objetivo: Estudiar el comportamiento de cuatro especies arbustivas mediterráneas ante un evento de contaminación por lodo pirítico, mediante un seguimiento del suelo y las plantas. Evaluación de su utilidad en fitorremediación de suelos mineros.

Materiales y Métodos

Cultivo de suelos y plantas

El suelo utilizado para este ensayo (Typic Xerofluvent) se recogió en la parcela experimental B2 de la zona “El Vicario” (37° 26' 21" N; 06° 13' 00" W, Aznalcóllar, Sevilla). El suelo se secó y tamizó a 4 mm y se homogeneizó usando una hormigonera. Para el experimento se utilizaron restos del lodo pirítico que se liberó de la balsa de contención minera en 1998 y contaminó la superficie de una gran área aguas abajo de Aznalcóllar (Simón y col., 1999). Dicho lodo se había almacenado en un congelador a -20 °C hasta que fue utilizado. El lodo se secó y tamizó a 2 mm antes de su aplicación a los suelos. Los tiestos que se utilizaron eran cilíndricos, con unas dimensiones de 230 cm² de superficie y 27 cm de altura, con una capa de 5 cm de arena gruesa en el fondo. Adicionalmente, se colocó un plato debajo del tiesto que recogía los lixiviados y dos telas de algodón que permitían el ascenso por capilaridad de dicho lixiviado al suelo. Los tiestos se rellenaron con 2 L de suelo mezclado con 2 L de grava gruesa (3-5 mm Ø). Los tiestos control se rellenaron con la mezcla descrita anteriormente (S); a los otros tiestos se añadieron, además de la mezcla, 150 g de lodo seco tamizado (S+LP) (5% de lodo, equivalente a 6000 t lodo km⁻²). Dicho porcentaje está en consonancia con la fracción remanente de lodo en experimentos llevados a cabo con suelos contaminados por el vertido (Domenech y col., 2002). El suelo utilizado era ligeramente ácido (en torno a 6), con un contenido de 1,3% de C y 0,07% de N, una textura franco-arenosa y una cantidad de Fe del 2,6% aproximadamente (Capítulo 3).

Las plantas de un año de edad de *Myrtus communis* (mirto), *Retama spaherocarpa* (retama), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Tamarix gallica* (taray) que se utilizaron en el ensayo se obtuvieron de un vivero de la Junta de Andalucía (San Jerónimo, Sevilla). Las plantas eran de tamaño similar a las empleadas en revegetación. Se trasplantó una planta por tiesto, habiendo 5 repeticiones de cada planta para cada tratamiento. También se usaron 5 repeticiones de tiestos sin planta. Se detalla un esquema del tiesto en la Figura 30 y un resumen de los tratamientos en la Figura 31.

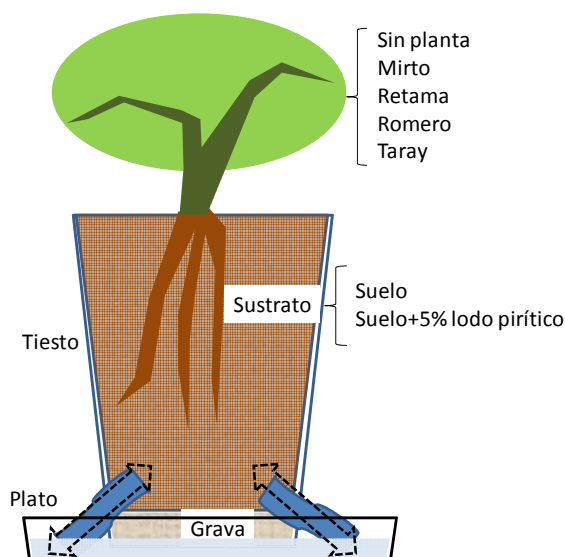


Figura 30. Esquema resumido del tiesto usado y el diseño experimental seguido.

El cultivo se realizó bajo cubierta con sombreado durante 2 años con unas condiciones similares a las de Aznalcóllar (T^a 40-5 °C y 800-900 mm año⁻¹). Después de 3 meses de cultivo, se hizo necesario añadir una enmienda caliza a los tiestos con 5% de lodo de 1-1,1 kg CaCO₃ m⁻² (equivalente a 24 g CaCO₃ tiesto⁻¹) para incrementar el pH de 3 hasta aproximadamente 7. En los resultados se detalla la forma en que se fijó dicha dosis mediante un ensayo de interacción estática: a 35 g de suelo con 35 mL de agua mili-Q se añadieron dosis crecientes de CaCO₃ puro. La mezcla se incubó aireada durante 24 h y se midió posteriormente el pH.

$n = 5$	No planta	Mirto	Retama	Romero	Taray
Suelo					
Suelo + lodo					

Figura 31. Resumen de los tratamientos aplicados.

Muestreo de suelos y plantas. Procesado y análisis de muestras

Suelo

El pH del suelo y su potencial red-ox se midió durante el ensayo usando un analizador multiparamétrico 18.21, Eijkelkamp®, Países Bajos. Para los muestreos intermedios a lo largo del cultivo, se recogieron 30 g aproximadamente de la zona superficial (0-10 cm) de cada tiesto, se secó al aire y se tamizó como se describe para el muestreo final. El muestreo de suelo final se realizó haciendo dos pequeños agujeros a lo largo del perfil del tiesto con ayuda de un cilindro de 4 cm de diámetro, mezclando todas las profundidades. Una muestra fresca se conservó a 4 °C para el posterior análisis de parámetros biológicos después de ser tamizada a 2 mm, y otra se secó en el invernadero durante una semana y se tamizó a 2 mm. Al final del ensayo, el pH del suelo se determinó en una suspensión 1:2,5 (s:l) en agua destilada o KCl 0,1 M, previa agitación durante 10 min y reposo de 30 min (MAPA, 1994). El N total (N_{Tot}) y el carbono orgánico (COT) en suelo se determinaron con un microanalizador automático EuroVector (EuroVector, Milan, Italia) según Clemente et al. (2008) en colaboración con el Grupo de Sostenibilidad del Sistema Suelo-Planta, perteneciente al CEBAS-CSIC (Murcia).

Los elementos traza totales en suelo se extrajeron digiriendo 0,5 g de suelo con HNO_3 y H_2O_2 en autoclave durante 30 min a 125 °C y 1,5 kPa (Capítulo 3), enrasando a 50 mL con agua mili-Q. La fracción disponible de arsénico se extrajo añadiendo 20 mL de $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 M a 2 g de suelo, agitándolo a 180 rpm durante 4 h (Moreno-Jiménez et al., 2009). Como los metales no fueron detectables por absorción atómica al final del ensayo, se realizó además otra extracción de metales disponibles utilizando la metodología *Rhizo* con una mezcla de ácidos orgánicos (Feng y col., 2005; Capítulo 3). Durante el cultivo se muestrearon los suelos sin planta inicialmente, a las 14 semanas del inicio y a las 18 semanas, para conocer los efectos de la acidificación y encalado posterior. Se procesaron de acuerdo a lo descrito anteriormente.

Para evaluar los efectos del encalado sobre el As, se sometió a los suelos de ambos sustratos en las estadíos inicial, acidificado (14 semanas tras el inicio del experimento) y recién encalado (18 semanas) a una extracción secuencial específica de As (Wenzel y col., 2001):

- Paso 1: Añadir 25 mL de $(NH_4)_2SO_4$ 0,05 M. Agitar durante 4 h, centrifugar a 3000 rpm 10 min y decantar. F1: no específicamente retenido.
- Paso 2: Añadir 25 mL de $NH_4H_2PO_4$ 0,05 M. Agitar 16 h, centrifugar y decantar. F2: específicamente retenido.
- Paso 3: Añadir 25 mL de oxalato amónico 0,2 M a pH=3,25. Agitar durante 4 h, centrifugar y decantar. F3: óxidos amorfos de Fe y Al.
- Paso 4: Añadir 25 mL oxalato amónico 0,2 M + ácido ascórbico 0,1 M a pH=3,25. Agitar 30 min a 96 °C, centrifugar y decantar. F4: óxidos cristalinos de Fe y Al.
- Paso 5: Digestión del residuo en ácido nítrico y agua oxigenada en autoclave durante 30 min a 125 °C y 1,5 kPa. Filtrado y diluido a 50 mL. F5: fracción residual.

Las extracciones se realizaron por duplicado.

La actividad enzimática en suelos se determinó en colaboración con el IMIDRA (Alcalá de Henares, Madrid). Para ello se utilizó el suelo fresco almacenado a 4 °C. Las actividades que se evaluaron fueron β -glucosidasa por el método del *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, ureasa usando urea como sustrato mediante determinación de amonio por voltimetría y fosfatasa ácida por el método del *p*-nitrofenil-fosfato:

Para la determinación de la actividad β -glucosidasa (García-Izquierdo y col., 2003), se añadieron 4 mL de tampón universal modificado (MUB), pH 6,5, 0,25 mL de tolueno y 1 mL del sustrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 0,025 M a 1 g de suelo húmedo, y se incubaron a 37 °C durante 1 h en agitación. Una vez transcurrido ese tiempo se enfría a 4 °C y se añaden por este orden 1 mL de CaCl_2 0,5 M y 4 mL de tampón Tris-hidroximetil-aminometano (THAM) 0,5 M, a pH 12, se agita la mezcla y se filtra a través de un papel de filtro. A continuación se mide la absorbancia a 400 nm. Paralelamente se incuban muestras control preparadas según el procedimiento anterior, modificado en lo que respecta a la aplicación del sustrato, que será posterior a la adición de tampón THAM, de modo que se resta la absorbancia debida a la extracción de sustancias contenidas en la matriz del suelo y/o a la presencia de trazas de *p*-nitrofenol en el sustrato. La curva de calibrado se realizó mediante diluciones de una disolución patrón de *p*-nitrofenol 7,2 mM.

La determinación de la ureasa se realizó siguiendo el procedimiento utilizado por Sastre-Conde y col. (2003). Se pesaron 2 g de suelo húmedo a los que se añadieron 8 mL de tampón fosfato 0,1 M, pH 7, y 2 mL de urea al 6,4%. Se tapan los erlenmeyers y se ponen a incubar a 37 °C con agitación durante 90 min. Transcurrido ese tiempo, se añaden 10 mL de KCl 2 M, se tapan y se deja en agitación durante 30 min. A continuación se filtra la muestra y el líquido filtrado se utiliza para la determinación de amonio mediante un electrodo selectivo. Paralelamente se realiza un blanco de cada muestra en el que se añaden 2 mL de agua destilada en lugar de la urea. Previamente a la determinación de amonio en las muestras, el electrodo se calibra con patrones realizados a partir de una disolución de NH_4Cl 0,01 M.

La determinación de fosfatasa ácida se realizó siguiendo el protocolo descrito por García-Izquierdo y col. (2003). A 1 g de suelo húmedo se le añadieron 4 mL de tampón MUB a pH 6,5 y 1 mL de *p*-nitrofenil-fosfato 0,025 M. La mezcla se agita a 37 °C en un incubador con agitación (120 v.p.m.) durante 1 h. Una vez transcurrido ese tiempo se enfría a 4 °C y se añaden, por este orden, 1 mL de CaCl_2 0,5 M y 4 mL de NaOH 0,5 M, agitándose vigorosamente. Se filtra y se mide la intensidad del color de los filtrados a 400 nm. Paralelamente se incuban muestras control preparadas según el procedimiento anterior, modificado en lo que respecta a la aplicación del sustrato, que será posterior a la adición de NaOH, de modo similar al procedimiento usado para la actividad β -glucosidasa. La curva de calibrado se realizó mediante diluciones de una disolución patrón de *p*-nitrofenol 7,2 mM.

Además se determinó la respiración total en los suelos suelo utilizando un sistema de determinación rápida por impedancia eléctrica, BAC-TRAC (SY-LAB, Neupurkersdorf, Austria). La medida se basa en la diferencia en los valores de impedancia que produce una disolución acuosa de KOH 0,2%, que se satura a medida que se desprende el CO_2 de la muestra de suelo. Se añaden 150 mg de la mezcla

talco:glucosa (10:1) a 30 g de suelo húmedo y tamizado a 2mm y se mezcla homogéneamente, pesando tres muestras de 5 g que se introducirán en el equipo. El tiempo de proceso son 48 horas y la temperatura de tratamiento 30°C.

Plantas

Las plantas se dividieron en raíz y parte aérea. La parte aérea se lavó con agua del grifo y se sumergió durante 2 min en agua destilada. Las partículas de suelo o sustrato en las raíces vegetales se eliminaron manualmente, luego se lavaron las raíces intensamente en agua del grifo. Posteriormente se sumergieron 2 veces en agua destilada durante 2 min tanto las raíces como las partes aéreas. Ambas se pesaron antes y después de secarse a 60 °C durante 3 días en la estufa. Las muestras secas se molieron y homogeneizaron. Las muestras vegetales se pesaron (0,5 g) y mineralizaron con HNO₃ y H₂O₂ en autoclave a 125 °C y 1,5 kPa durante 30 min (Lozano-Rodríguez et al., 1995), enrasando a 25 mL con agua mili-Q. Los metales pesados en muestras de suelo y planta se determinaron por espectroscopía de absorción atómica y el arsénico mediante fluorescencia atómica (Capítulo 3).

Adicionalmente, se realizaron 2 muestreos, en verano de 2006 y 2007 respectivamente, de brotes jóvenes para realizar un seguimiento a lo largo del cultivo. Las muestras se procesaron como se ha descrito arriba.

Procesado de datos y análisis estadístico

La transferencia de elementos traza del suelo y la raíz a la parte aérea se determinó hallando el factor de transferencia y la relación parte aérea-raíz del elemento traza (ET):

-Factor de transferencia (TF) = $[ET]_{PA}/[ET]_{suelo}$.

-Relación de la concentración de As en parte aérea con respecto a raíz $[ET]_{PA}/[ET]_{raíz}$.

-El incremento porcentual de la respiración del suelo debida a la presencia de planta se calculó con respecto a los tiestos sin planta, según la ecuación: $100 \cdot (CO_2_{suelo+planta} - CO_2_{suelo})/CO_2_{suelo}$.

Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico SPSS® para Windows. Se realizaron análisis ANOVA de 2 factores con interacción para evaluar el peso de los factores estudiados: la presencia de lodo y la especie vegetal.

Resultados y Discusión

Evolución

Evolución de los suelos

Este apartado va a centrarse especialmente en los tiestos que tenían un aporte del 5% de lodo, que fueron los que sufrieron grandes cambios asociados a la geoquímica de la pirita en suelos. El aspecto de los tiestos a los 10 meses del inicio del experimento es el que se observa en la Figura 32.



Figura 32. Aspecto de los tiestos 10 meses después de iniciarse el experimento.

Los suelos sin lodo mostraron un comportamiento bastante constante en el tiempo, si exceptuamos un leve incremento del pH (de 6,1 a 6,5) fruto del riego con un agua con una dosis baja de carbonatos ($\text{pH}=7,2$; $30 \text{ mg HCO}_3^- \text{ L}^{-1}$). En los suelos tratados la presencia de lodo pirítico ocasionó cambios drásticos. La ecuación de oxidación de la pirita (Introducción, Apartado 1.7) indica el carácter fuertemente ácido de la reacción. La presencia de pirita/arsenopirita proporciona los reactivos necesarios y la de microorganismos acelera la reacción. Este fenómeno, junto con la baja presencia de carbonatos, indicaba que los suelos tarde o temprano sufrirían una acidificación. Esta acidificación es síntoma de la oxidación de los sulfuros, y provoca la liberación de los metales (Cd, Cu y Zn) y metaloides (As) asociados (Davies-McConchie y col., 2002). Pero también es bien conocido que la acidez libera el Al (Delhaize y Ryan, 1995) y el Mn (Vázquez y col., 2006a) del suelo. Si los compuestos liberados no son retenidos en el suelo, serán susceptibles de transferencia a la planta o de lixiviación, suponiendo un riesgo ambiental. Volviendo a nuestros resultados, el pH de los tiestos tratados descendió durante las 14 primeras semanas, aunque fue especialmente preocupante durante las semanas 12 a 14, en las que el pH en el suelo descendió hasta 3, lo que ponía en peligro la supervivencia vegetal (Vázquez y col., 2008a). En este punto, la concentración de metales (Al,

Cd, Cu, Mn y Zn) y As solubles en el suelo se había incrementado de forma espectacular desde el principio del ensayo (Figura 33). Por todo ello, se adopta la solución urgente de encalar el suelo.

Los datos corroboran las observaciones de Aguilar y col. (2004a), que describen una liberación más rápida del Cu y Zn del lodo que la del As. La liberación de As asociada a la disminución de pH en el suelo estaría asociada a la oxidación de la arsenopirita a arseniato, que a $\text{pH} < 4$ puede protonarse completamente, dando lugar a H_3AsO_4 que por su carácter neutro es más difícilmente retenido en el suelo que las formas desprotonadas del ácido (Zhang y Selim, 2008). En los tiestos sin lodo no se produjeron grandes cambios en la disponibilidad de elementos traza ni en el pH, por lo que no se encalaron.

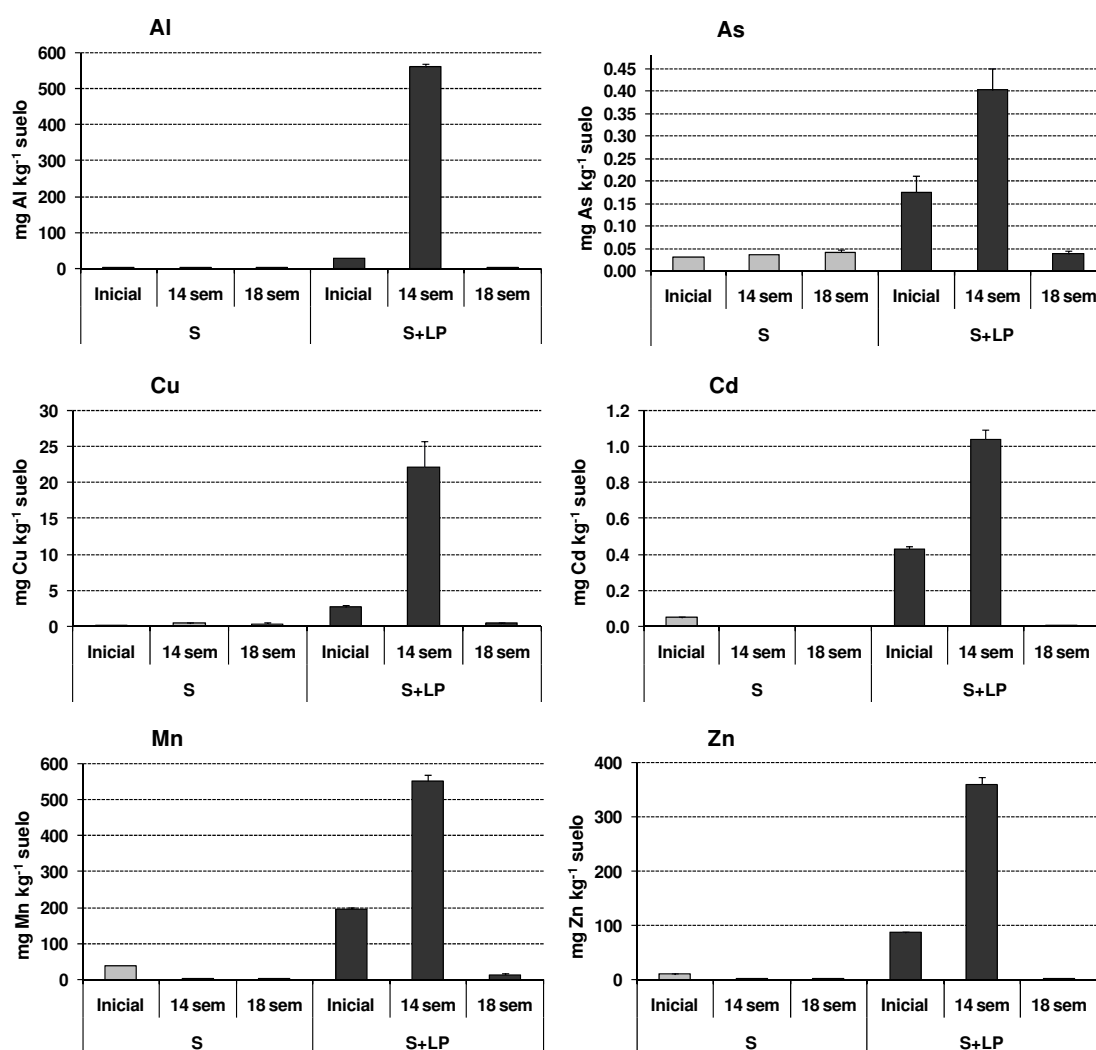


Figura 33. Evolución del Al, As, Cd, Cu y Zn extraíbles con sulfato amónico 0,1 M en los suelos durante los primeros 4 meses de ensayo. S: suelo sin lodo; S+LP: suelo con 5% de lodo pirítico; sem: semanas desde el inicio. Media \pm EE, $n=3$.

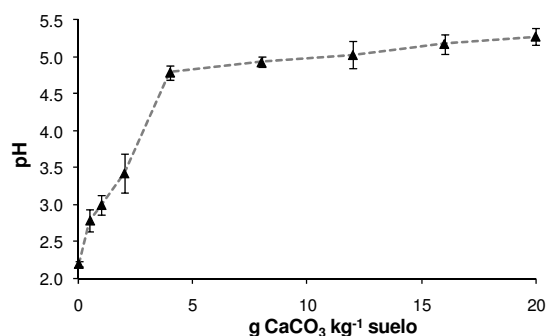


Figura 34. Ensayo estático de interacción del suelo acidificado con distintas dosis de carbonato cálcico, humedecido y en contacto con el aire. Media \pm EE, $n=3$.

Para fijar la dosis de encalado se realizó un ensayo de interacción estática con los suelos con 5% de lodo y distintas dosis de carbonato. La Figura 34 muestra los resultados de dicho ensayo. Se aprecia como al aumentar la dosis de carbonato aumenta el pH. Este aumento fue muy destacable a dosis bajas de carbonatos, pero a dosis altas se produce una ralentización del efecto, con cambios más leves y menos significativos. Ello lleva a pensar que las 24 h no fueron suficientes para que los carbonatos aportados reaccionasen, pero la necesidad de evitar la muerte de las plantas obligó a fijar urgentemente una dosis de partida. Dicha dosis fue de 8 g kg^{-1} suelo, es decir, 24 g tiesto^{-1} (aproximadamente $1 \text{ g CaCO}_3 \text{ cm}^{-2}$). Su equivalencia en campo sería de $10\text{-}11 \text{ ton ha}^{-1}$, similar a la propuesta por Aguilar y col. (2007b) como óptima para subir el pH de un suelo de la zona de Aznalcóllar de 4 a 6,5, pero mayor que el utilizado en otros experimentos de inmovilización de metales en suelos de la misma zona afectada por el vertido (Aguilar y col., 2004b).

Una vez encalados, el pH de los suelos tratados con 5% de lodo pirítico aumentó paulatinamente desde 2,2-2,6 hasta estabilizarse entre 6 y 7 en todos los tiestos 4 semanas después del encalado. Como consecuencia, la fracción extraíble con sulfato amónico de Al, As, Cd, Cu, Mn y Zn descendió hasta valores incluso menores que los de los suelos no tratados (Figura 33). El efecto inmovilizador de metales del aumento del pH en un suelo tras un encalado se conoce sobradamente (Basta y McGowen, 2004). Sin embargo el caso del As es destacable: muchos autores han descrito que aumentos de pH en el suelo liberan As (Jain y col., 1999; Fitz y Wenzel, 2002). Este principio general debe ser matizado en el caso de contaminación del suelo por residuos piríticos, donde la acidificación edáfica indica liberación del As y otros elementos que estaban asociados a los sulfuros (Davies-McConchie y col., 2002). En este caso en particular, ese As que se había inmovilizado durante la oxidación es coprecipitado junto a minerales de Fe al aplicar los carbonatos, o incluso es retenido en sulfatos y carbonatos del suelo (Sadiq, 1997; Domenech y col., 2002), sin que haya una competencia destacable entre los aniones arseniato y carbonato por los lugares de retención del suelo (Stachowicz y col., 2008). Entre los minerales neoformados tras un proceso de acidificación de la pirita podemos tener sulfatos (yeso y jarosita en importantes cantidades), arseniato férrico (Álvarez-Ayuso y col., 2008), e incluso podría precipitar arseniato cálcico, con un $\text{pK}_s=18,2$ (Burriel y

col., 1999). Por todo ello, el encalado de los suelos acidificados ayudó a inmovilizar el As además de los metales.

Para estudiar la geoquímica del As y su fraccionamiento en el suelo se realizó una extracción secuencial en los distintos estadíos que fueron sucediendo (Figura 35). El suelo sin tratar muestra cambios leves del fraccionamiento del As, acaso un aumento no significativo del As disponible (F1 y F2) debido probablemente al leve aumento del pH de 6 hasta casi 7.

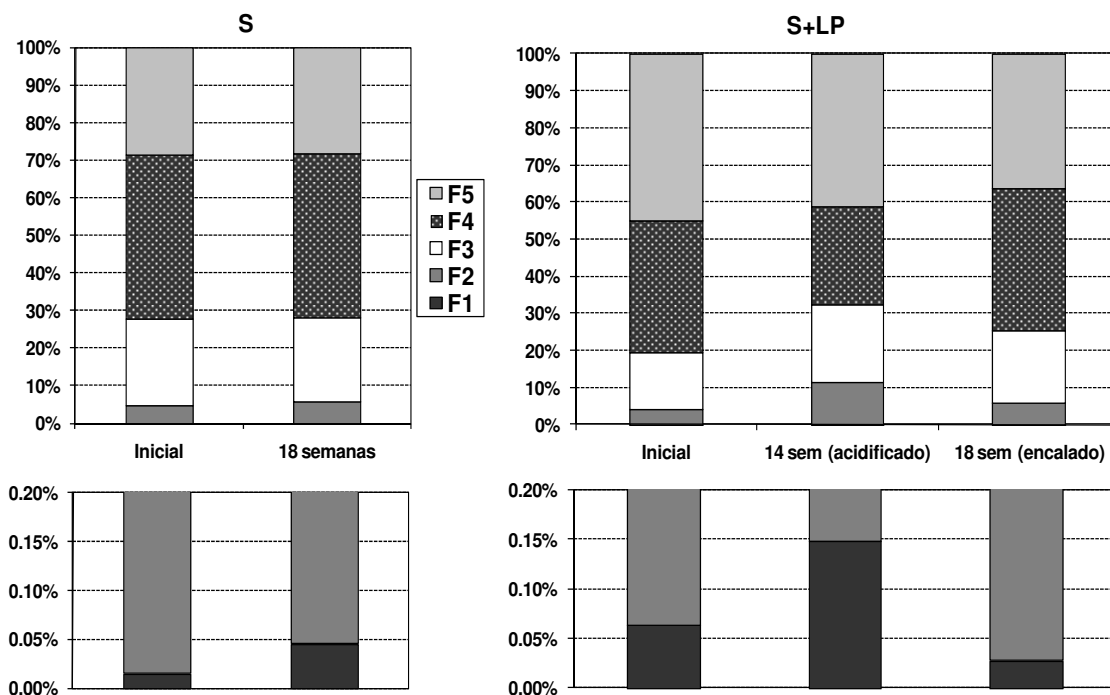


Figura 35. Fraccionamiento de As en los suelos de los tiestos: inicial, acidificados (14 semanas) y encalados (18 semanas). Media, $n=2$. F1: no específicamente retenido; F2: específicamente retenido; F3: óxidos amorfos de Fe y Al; F4: óxidos cristalinos de Fe y Al; F5: fracción residual (Wenzel y col., 2001). Abajo, F1 en mayor detalle.

Los cambios más importantes se observan de nuevo en los suelos con 5% de lodo pirítico: a las 14 semanas se produce un importante incremento de las fracciones 1 y 2, asociadas al As móvil/movilizable en el suelo (Fitz y col., 2003). Sin embargo, después del encalado la F1 disminuye drásticamente, por debajo de los niveles del inicio del experimento, y la F2 se hace menos abundante que en el momento de la acidificación, recuperando casi los valores iniciales. La F3 aumenta durante la acidificación para luego permanecer constante después del encalado. La F5, asociada a los sulfuros, disminuye a lo largo del tiempo, haciéndose patente su oxidación. Es la F4 la que explica mayoritariamente el descenso de la disponibilidad del As después del encalado, ya que aumenta durante las semanas 14 a 18. Esta fracción se asocia a óxidos cristalinos de Fe y Al (Wenzel y col., 2001), por lo que cabe suponer que el encalado ocasione la precipitación del Fe y el Al, que a su vez retiene el As en dichos óxidos neoformados. Sin

embargo, en el artículo de Wenzel y col. (2001) no se realiza una caracterización mineralógica exhaustiva de las fracciones en el suelo, por lo que no debe descartarse que en este paso 4 puedan extraerse sales no asociadas a Fe/Al que sean capaces de retener As, como sulfatos, carbonatos o incluso arseniatos. En cualquier caso, durante el encalado esa es la fracción que parece estar controlando la inmovilización efectiva del As disponible en condiciones ácidas. El problema de este encalado drástico es que podría provocar la coprecipitación de nutrientes análogos en dinámica en el suelo al As como el P. Ello podría afectar a la calidad del suelo a largo plazo.

Evolución de las plantas

Solamente se muestrearon brotes jóvenes para dañar lo menos posible a la planta y porque son más sensibles a cambios en la nutrición mineral. Las plantas fueron testigos de los cambios en los suelos (Tabla 24). Así, las plantas crecidas únicamente sobre suelo sufrieron pocos cambios en la concentración de elementos traza en los brotes jóvenes, disminuyendo en el caso del Al debido probablemente al agotamiento de la reserva de Al disponible y al ligero aumento del pH en los suelos (de 6 a 7 en el caso de los tiestos sin aporte de lodo). Por otro lado, las plantas crecidas sobre suelos con lodo estuvieron afectadas por la acidificación intensa en el muestreo de 2006, por lo que mostraron unos niveles de Al, As (en algunos casos), Cu, Cd, Mn y Zn más altos en brotes jóvenes que las crecidas sólo sobre suelo. Especialmente altos son los valores de Al, Mn y Zn en algunos casos, y el de Cu en mirto. Sin embargo en el año 2007, cuando el encalado había sido efectivo durante un largo plazo de tiempo, estos niveles no fueron excesivamente altos, es decir, la planta no era capaz de tomar aquellos elementos inmovilizados por el encalado. Cabe destacar los niveles altos de Cd en el taray. Para realizar una comparación de los niveles obtenidos en las plantas con niveles referencia, los niveles de elementos en brotes jóvenes en 2006 no superan el umbral genérico de toxicidad para plantas descrito para Cd, Cu y Zn por Gardea-Torresdey y col. (2005), para el As por Chaney (1989) y para Mn por Álvarez y col. (2002) en ningún momento, aunque el valor de Cu en mirto en 2006 se aproxima bastante a su umbral. En 2007 los valores de elementos traza en brotes jóvenes disminuyeron, por lo que todavía están más alejados de dichos umbrales. Los niveles normales de aluminio en plantas se encuentran en torno a 200 ppm (Menguel y Kirkby, 2001), por lo que los niveles tampoco son excesivamente altos en ninguna especie de las estudiadas, excepto en romero para el muestreo de 2006.

Tabla 24. Concentración de elementos traza ($\mu\text{g g}^{-1}$) en brotes jóvenes de plantas de arbustos mediterráneos cultivadas durante 4 (2006) y 16 meses (2007). Media, $n=3-4$. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el tratamiento control y el que tiene 5% de lodo pirítico para cada especie ($P < 0,05$).

	Al		As		Cd		Cu		Mn		Zn	
	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07
S												
Mirto	108	72	0,38	0,37	n.d.	n.d.	8,0	8,2	46	92	36	33
Retama	117	35	0,29	0,40	n.d.	n.d.	7,1	11	28	24	44	50
Romero	684	193	0,24	0,42	n.d.	n.d.	6,7	14	42	31	74	99
Taray	112	78	0,19	0,32	0,54	0,43	12	15	31	102	99	65
S+LP												
Mirto	108	67	0,69*	0,37	n.d.	0,08*	121*	31*	1044*	518*	170*	76*
Retama	128	52	0,33	0,43	0,05*	n.d.	17*	19	163*	120*	94*	100*
Romero	1054*	132	0,47*	0,47	n.d.	n.d.	16*	12	460*	166*	93*	133*
Taray	404*	212*	0,25	0,43*	0,63	1,94*	18*	18*	1283*	496*	239*	185*

Además se determinó la altura de las plantas en los veranos de 2006 y 2007 y se comparó con el estado inicial (en el caso del 2006) o con el estado en 2006 (en el caso de 2007), obteniéndose el porcentaje de aumento (Figura 36). Inicialmente la parte aérea creció durante la primera primavera y verano, aunque el efecto de la acidificación y absorción de elementos traza mermó el crecimiento de las plantas durante esos 6 primeros meses en los tratamientos con lodo. Sin embargo en 2007 los efectos del lodo fueron menores debido al encalado, por lo que las plantas tratadas y no tratadas tuvieron un desarrollo similar. El desarrollo en 2007 fue menor probablemente porque el sistema de cultivo adoptado (5 L con solo 2,2 L de suelo) empezaba a ser limitante para plantas tan grandes.

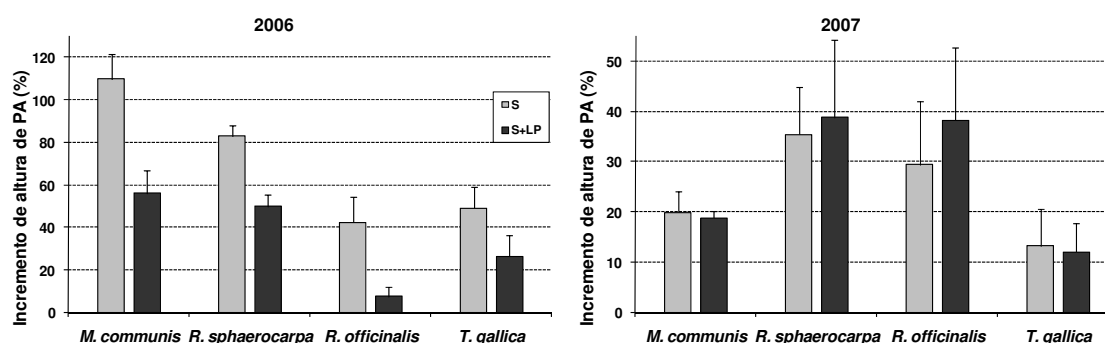


Figura 36. Incremento (%) de la longitud de la parte aérea (PA) tras 6 meses y 18 meses de cultivo de las plantas arbustivas sobre suelos o suelos con aporte de 5% de lodo pirítico. Media \pm EE, $n=5$.

De acuerdo con nuestra hipótesis de que los indicadores pueden ser una herramienta útil para diagnosticar los efectos tóxicos de los elementos traza, se realizó la determinación de algunos indicadores de estrés (Tabla 25) en los mismos brotes jóvenes en que se analizaron los elementos traza (Tabla 24). Los resultados muestran diferencias significativas debidas al estrés producido por la presencia de lodo en casi todas las plantas durante el año 2006. En retama era esperable una baja respuesta de los tioles y el MDA, hecho que ya se había comprobado en el ensayo hidropónico (Capítulo 4). Sin embargo, en el segundo año no se produjeron tantas diferencias entre los tiestos control con los tiestos tratados para ninguna especie, si exceptuamos algunos síntomas de estrés en mirto y romero. Los indicadores muestran el grado de “bienestar” de la planta y su aclimatación a la situación en la que está viviendo. Como se aprecia claramente y de acuerdo a lo observado con el crecimiento de la parte aérea, el encalado fue eficaz y permitió un desarrollo vegetal menos estresante para la planta.

Tabla 25. Bioindicadores: concentración de tioles, malondialdehído ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y clorofila *a* (mg g^{-1} PF) en brotes jóvenes de plantas de arbustos mediterráneos cultivadas durante 4 (2006) y 16 meses (2007). Media, $n=3-4$. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el tratamiento control y el que tiene 5% de lodo pirítico para cada especie ($P < 0,05$).

	Tioles		MDA		Chl <i>a</i>	
	06	07	06	07	06	07
S						
Mirto	303	339	28,7	22,9	0,72	0,67
Retama	146	130	34,0	28,4	0,59	0,58
Romero	246	397	14,5	15,6	0,45	0,28
Taray	115	98	36,4	39,1	0,66	0,33
S+LP						
Mirto	373*	322	35,4*	26,7	0,63*	0,54*
Retama	157	138	44,3	31,1	0,48*	0,53
Romero	297*	384	23,0*	18,2*	0,33*	0,24
Taray	168*	119*	40,7*	40,4	0,57*	0,36

Muestreo final

Parámetros químicos y biológicos en suelos

La caracterización química de algunos parámetros de suelo después de 20 meses de cultivo vegetal se muestra en la Tabla 26. El pH del suelo se mantuvo parecido entre suelos sin lodo y con él hasta el final del cultivo gracias al encalado. El pH se vio afectado por la especie vegetal cultivada en el suelo ($P < 0,001$), el tipo de sustrato ($P < 0,001$) y su interacción ($P < 0,01$). El pH analizado en todos los tiestos estuvo dentro de un rango normal en suelos y no supone ningún riesgo. En cuanto a la aplicación de lodo

pirítico, la acidificación inicial debida a la oxidación de la pirita se corrigió eficazmente por la enmienda, manteniéndose el pH entre 6 y 8 hasta el final del cultivo. Es de destacar que el cultivo de romero y taray aumentó el pH en los suelos control (sin aporte de lodo). Por su parte, el de retama y mirto disminuyó el pH en los suelos tratados con lodo. La retama es una leguminosa y en caso de fijación de N_2 la planta puede provocar una acidificación al requerir más cationes que aniones del suelo, ya que el N se toma de la atmósfera, por lo que exuda protones para absorber el exceso de cationes (Haynes, 1983). En el caso del mirto no se ha descrito ningún tipo de fijación simbiótica de N.

Los niveles de carbono en suelo también se vieron afectados por ambos factores y su interacción ($P < 0,001$). El lodo pirítico provocó una disminución del porcentaje de C generalizada comparada con los tiestos no tratados, mientras que el cultivo vegetal aumentó como norma general el contenido de C de los suelos. Entre las especies utilizadas, mirto y retama aumentaron el C en suelos sin tratar y tratados con lodo pirítico, mientras el romero solo aumentó el C en suelos control. Los aportes de hojarasca al suelo, las raíces muertas y los exudados parecen ser la causa más probable de este aumento de C en suelos. Por su parte, el taray no aumentó el contenido de C del suelo en ningún caso. El papel de la materia orgánica y el C en suelos es de sobra conocido y sus efectos suelen ser positivos, sobre todo en terrenos mediterráneos degradados, que presentan frecuentemente niveles bajos o muy bajos de C orgánico. La materia orgánica aporta estabilidad a la estructura del suelo, mejora la capacidad de retención hídrica, es capaz de retener cationes y aniones (ya sean nutrientes o contaminantes) (Porta y col., 2003), y es un reservorio de C (Torn y col., 1997). Todo ello hace que un incremento de la materia orgánica del suelo se haya relacionado frecuentemente con una mejora en la calidad del suelo, sobre todo en el marco de los suelos mediterráneos degradados. En el caso del N se observa un patrón similar al del C: ambos factores ($P < 0,001$) y su interacción ($P < 0,01$) influyeron significativamente sobre los niveles de N en suelo. De nuevo son la retama y el mirto los que provocaron un mayor incremento de N en suelo. El incremento de N en el suelo puede atribuirse a la presencia de restos vegetales en descomposición y a la fijación de N. La retama es una leguminosa capaz de establecer relaciones simbióticas con *Rhizobium* sp. (Valladares y col., 2002), pero en mirto se desconocen dichas infecciones simbióticas. Como vimos en el anterior ensayo (Capítulo 5), el tejido radicular de retama se mineralizaba más rápidamente que el de otras especies arbustivas mediterráneas, hecho que puede favorecer el enriquecimiento del suelo en N. En el caso del mirto el aumento de N puede ser debido a la mineralización de tejidos vegetales o a la presencia de microorganismos en el suelo. La fijación de N en suelos se puede producir por organismos simbioses pero también por organismos de vida libre (Menguel y Kirkby, 2001), por lo que el mirto podría favorecer la actividad de organismos fijadores de N de vida libre en el suelo. El contenido de N de un suelo es otro índice de la calidad química de un suelo y de su fertilidad. Los niveles de C y N en estos suelos son similares a aquellos descritos para zonas mediterráneas degradadas (García y col., 2000), aunque la presencia de plantas en algunos casos acerca los valores de ambos parámetros a la normalidad para suelos mediterráneos.

La concentración total de As, Cd, Cu y Zn en suelos se vio incrementada por la aplicación de lodo pirítico ($P < 0,001$). Sin embargo, la concentración total de Mn disminuyó por dicha aplicación ($P < 0,001$), lo que pone de manifiesto que el lodo no presentaba niveles altos de Mn. Ni el cultivo de plantas ni la interacción entre el cultivo y el sustrato tuvieron influencias significativas sobre los niveles de As, Cd, Cu y Mn. En una fitoestabilización no se persiguen cambios del contenido total en suelo, sino el confinamiento del elemento contaminante en el mismo. Sin embargo, en el caso del Zn sí se observó un leve efecto ($P < 0,05$) del cultivo y la interacción cultivo-sustrato. Estas diferencias no se observan en el suelo control, pero en los suelos tratados con lodo, la concentración de Zn en suelo fue aproximadamente un 20% menor en los suelos con planta que en el suelo sin planta. La concentración de elementos traza tanto en el suelo como en el sustrato tras la aplicación del 5% de lodo se encontró en el rango descrito para los suelos afectados tras el vertido minero de Aznalcóllar por Cabrera y col. (1999), lo que pone de manifiesto que se han ensayado dosis reales que podrían ser equivalentes a aquellas que se pueden encontrar en campo. Si comparamos los valores de As, Cd, Cu y Zn obtenidos, solamente el suelo afectado por lodo muestra valores de As superiores al límite para espacios naturales (BOJA, 1999).

Tabla 26. Propiedades del suelo después de 20 meses de cultivo: pH (en agua y en KCl), C, N y elemento total.

Sustrato (Ss)	Especie (Esp)	pH		C (%)	N (g kg ⁻¹)	Concentración total (mg kg ⁻¹)				
		Agua	KCl			As	Cd	Cu	Mn	Zn
Suelo										
	No planta	6,92 ± 0,05	6,10 ± 0,05	0,98 ± 0,02	0,97 ± 0,12	85,7 ± 2,7	1,72 ± 0,04	98,6 ± 1,2	588 ± 8	317 ± 3
	<i>M. communis</i>	6,88 ± 0,06	6,07 ± 0,02	1,24 ± 0,08	1,13 ± 0,05	76,5 ± 3,4	1,71 ± 0,06	95,5 ± 1,7	572 ± 15	310 ± 8
	<i>R. sphaerocarpa</i>	6,84 ± 0,07	6,10 ± 0,04	1,13 ± 0,04	1,30 ± 0,15	80,6 ± 3,1	1,79 ± 0,05	104,6 ± 2,0	611 ± 22	326 ± 4
	<i>R. officinalis</i>	7,26 ± 0,07	6,44 ± 0,02	1,20 ± 0,03	0,92 ± 0,01	78,3 ± 6,2	1,60 ± 0,07	104,0 ± 3,5	564 ± 3	316 ± 3
	<i>T. gallica</i>	7,45 ± 0,07	6,41 ± 0,02	1,06 ± 0,01	1,02 ± 0,07	72,8 ± 2,6	1,67 ± 0,10	97,1 ± 0,5	552 ± 6	303 ± 4
Suelo con lodo pirítico (5%)										
	No planta	7,17 ± 0,08	6,23 ± 0,03	0,88 ± 0,02	0,53 ± 0,03	252 ± 8	2,20 ± 0,09	129 ± 3	550 ± 39	491 ± 31
	<i>M. communis</i>	6,34 ± 0,11	6,03 ± 0,02	0,98 ± 0,02	0,67 ± 0,02	214 ± 7	1,85 ± 0,09	117 ± 6	412 ± 2	390 ± 17
	<i>R. sphaerocarpa</i>	6,21 ± 0,25	5,90 ± 0,17	0,95 ± 0,03	0,64 ± 0,01	227 ± 2	1,90 ± 0,18	123 ± 3	375 ± 31	387 ± 20
	<i>R. officinalis</i>	6,91 ± 0,03	6,08 ± 0,05	0,81 ± 0,04	0,50 ± 0,04	230 ± 9	2,19 ± 0,09	116 ± 3	371 ± 20	375 ± 22
	<i>T. gallica</i>	6,77 ± 0,05	6,10 ± 0,06	0,88 ± 0,04	0,47 ± 0,03	259 ± 16	1,93 ± 0,13	119 ± 4	438 ± 65	377 ± 34
ANOVA	Ss	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***
	Esp	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	0,160ns	0,398ns	0,085ns	0,239ns	0,010*
	Ss*Esp	0,001**	0,002**	<0,001***	0,001**	0,612ns	0,072ns	0,074ns	0,166ns	0,020*

Respecto al elemento fácilmente extraíble (Figura 37, Tabla 27) y en el caso de los metales, los métodos analíticos utilizados no permitieron detectar su concentración en el extracto de sulfato amónico, por lo que se realizó una extracción adicional usando una disolución de ácidos orgánicos (*RHIZO*). Aunque las diferencias entre sustratos fueron significativas, la concentración de metal extraíble se mantuvo siempre en el mismo orden de magnitud entre ambos sustratos. En algunos casos, la presencia de planta movilizó algunos elementos como el Zn y el Cu, sobre todo en el caso de suelo con lodo cultivado con ratama o mirto. Ambos son micronutrientes y por tanto las plantas los necesitan para desarrollarse. Así, las raíces vegetales pueden exudar ácidos orgánicos que los complejen y los movilicen del suelo. El único metal que muestra una extractabilidad mayor en los suelos a los que se aplicó el lodo es el Cd, llegando casi a duplicar el Cd extraíble en los suelos sin lodo. Los niveles de Cd fácilmente extraíble disminuyeron gracias al cultivo de taray en los suelos. Con el As pasa algo peculiar, como puede verse existen diferencias en la extractabilidad de As evaluada en un caso por una extracción con sulfato amónico y en otro con ácidos orgánicos rizosféricos (*rhizo*). Las diferencias en As extraíble entre suelos con lodo y encalado y el suelo original son poco marcadas en el caso del sulfato amónico, pero son muy marcadas en el caso del método *RHIZO*. Es imposible discernir cual método es mejor para evaluar la fitodisponibilidad en este punto, ya que las plantas han registrado inicialmente los cambios bruscos de disponibilidad durante la acidificación y el encalado, actuando como un registro continuo de lo que va ocurriendo (Madejón y col., 2006b), pero poco útil para un momento puntual como es el que nos ocupa. Por tanto, en este momento es más apropiado hablar de fracción de elementos traza extraíble con sulfato amónico o con solución de ácidos orgánicos de bajo peso molecular típicos de la rizosfera. En ambos métodos se observa una cierta tendencia a disminuir el As extraíble por la presencia de plantas, siendo incluso significativo este descenso ($P < 0,001$). Se puede comprobar la eficacia del efecto inmovilizador del encalado aplicado 18 meses antes del muestreo, ya que los niveles de metales y As en las fracciones más débilmente retenidas no fueron en ningún caso tan elevados como en algunos suelos de la parcela El Vicario. En algunos puntos de dicha parcela la contaminación derivada del lodo pirítico ha ocasionado problemas de acidez y de presencia de elementos traza en estas fracciones extraíbles con sulfato amónico o con ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Hevia, 2007). Así, en la propia parcela experimental objeto de estudio por nuestro grupo de investigación, se han llegado a detectar niveles de As, Cd, Cu, Mn y Zn de hasta 2,5; 3,5; 3,5; 400 y 90 mg kg⁻¹ extraíble en sulfato amónico (Capítulo 3; Hevia, 2007), debido a una ausencia de actuaciones de inmovilización química (p. ej., encalado). En el estudio de tiestos que nos ocupa, el As estuvo muy por debajo y los metales estuvieron por debajo del límite de detección en sulfato amónico, pero incluso en extracto *RHIZO* los niveles de metales en tiestos fueron menores que en sulfato amónico en la parcela experimental, a pesar de que el *rhizo* es una solución extractante más fuerte (Capítulo 3).

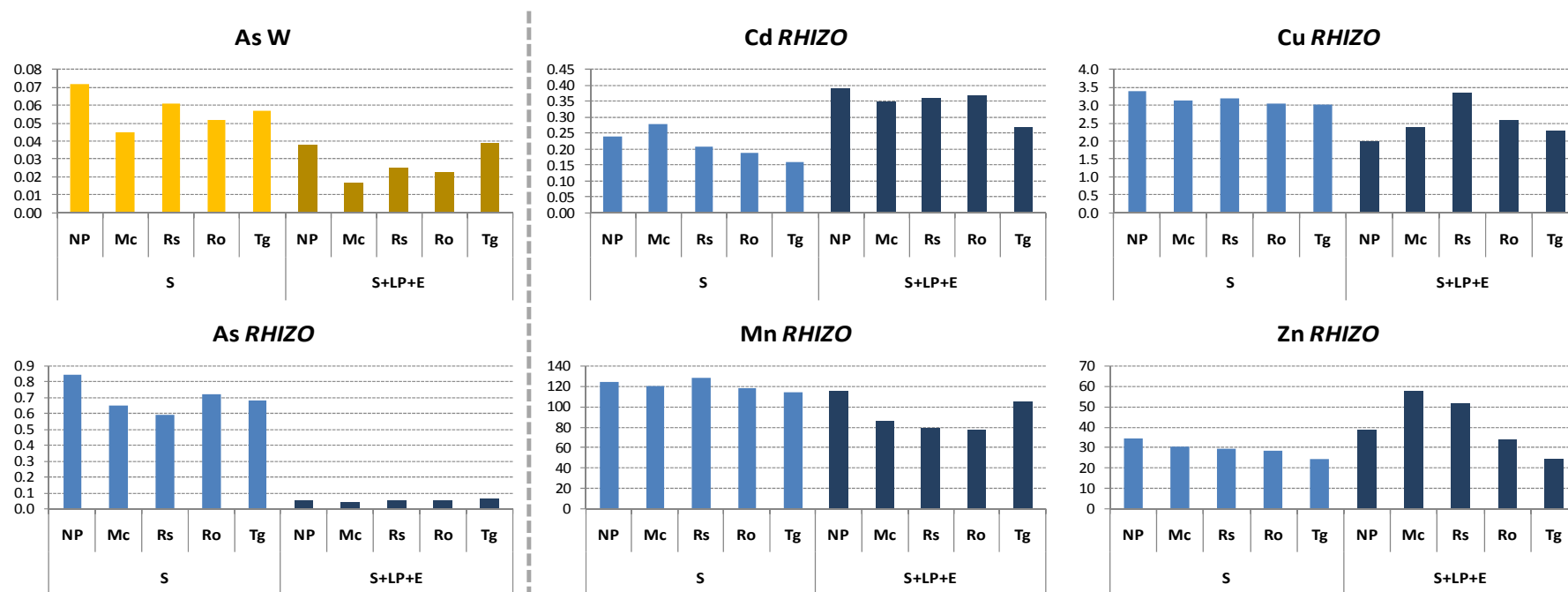


Figura 37. Concentración de As extraíble en suelo (mg kg^{-1}) con sulfato amónico (W) y con una mezcla de ácidos orgánicos (RHIZO): gráficos de la izquierda. En el centro y a la derecha, concentración de metales extraíbles en suelo (mg kg^{-1}) con la mezcla de ácidos orgánicos rizosféricos. S: suelo (colores claros); S+LP+E: suelo con 5% de lodo pirítico y encalado (oscuros); NP: sin planta. Media, $n=5$. La concentración de Al estuvo por debajo del límite de detección en la mayoría de los suelos.

Tabla 27. Estadística asociada a la Figura 37. Ss: sustrato; Esp: especie.

ANOVA 2F	As W	As RHIZO	Cd RHIZO	Cu RHIZO	Mn RHIZO	Zn RHIZO
Ss	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***
Esp	<0,001***	0,026*	<0,001***	0,084 ^{ns}	0,234 ^{ns}	<0,001***
Ss*Esp	0,175 ^{ns}	0,032*	0,036*	0,029*	0,168 ^{ns}	<0,001***

La actividad enzimática en suelos se usa frecuentemente como indicador de la calidad biológica para monitorizar la recuperación de suelos degradados desde principios de los años 90 (Bentham y col., 1992). En el caso de la fitorremediación, se ha demostrado que los indicadores biológicos de la calidad del suelo son herramientas útiles para monitorizar la eficacia de la técnica debido a su sensibilidad, repuesta rápida y su carácter integrador (Epelde y col., 2009a). Para el presente estudio se eligieron una enzima implicada en el ciclo del C (β -glucosidasa), una del ciclo del N (ureasa) y otra del ciclo del P (fosfatasa ácida) (Figura 38, Tabla 28). Adicionalmente se determinó la respiración total en suelo, un indicador de la cantidad total de microorganismos, también relacionada con el ciclo del C.

En el caso de la β -glucosidasa la aplicación de lodo pirítico causó una disminución significativa de la actividad en suelo ($P < 0,001$) y la interacción sustrato-especie vegetal también provocó diferencias significativas ($P < 0,001$). El cultivo de plantas provocó un aumento de la actividad de dicha enzima implicada en el ciclo del C respecto al suelo sin planta ($P < 0,05$). La actividad total, medida mediante la respiración del suelo, estaría relacionada con el total de microorganismos en el suelo. En este caso, el cultivo de ciertas especies vegetales (mirto, retama y taray especialmente de nuevo) provocó un incremento de la respiración ($P < 0,001$), aunque también se observaron diferencias significativas asociadas a la interacción especie-sustrato ($P < 0,05$). Los sustratos en los que se plantaron retamas se comportaron de forma diferente al resto de especies respecto a la actividad total: aumentó en mayor medida la actividad total de los tiestos sin lodo, mientras el cultivo del resto de especies mostraron mayor aumento relativo en los tiestos afectados por lodo. Por tanto, el cultivo de mirto, retama o taray tuvo efectos positivos sobre actividades relacionadas con el ciclo del C, llegando a duplicar o triplicar los niveles de β -glucosidasa respecto a los suelos sin plantar y a duplicar la respiración del suelo.

La actividad ureasa se vio afectada por todos los factores: especie cultivada ($P < 0,01$), sustrato e interacción entre ambos factores ($P < 0,001$). En el caso de los suelos sin lodo, en los que se cultivaron retama o mirto duplicaron los niveles de actividad ureasa respecto a la actividad en los suelos sin planta. Los efectos del cultivo de taray y romero fueron menores.

Con respecto al ciclo del P, la actividad fosfatasa ácida no se mostró afectada por la aplicación de lodo y posterior encalado, aunque el cultivo vegetal y la interacción especie-sustrato tuvieron efectos significativos sobre la actividad ($P < 0,001$ y $P < 0,01$ respectivamente). Los cambios provocados por el cultivo vegetal sobre esta actividad no fueron tan espectaculares como para las enzimas implicadas en el ciclo del C y el N, llegando a aumentar la actividad fosfatasa en hasta un 40% en el caso de la retama.

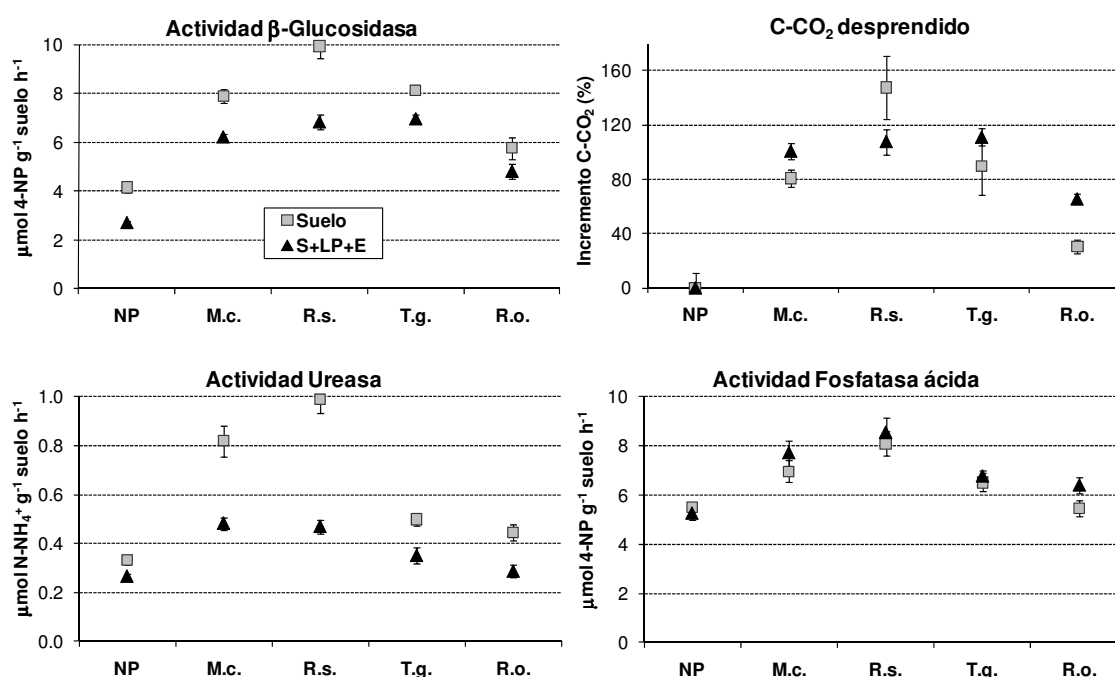


Figura 38. Actividades enzimáticas y respiración microbiana (C-CO₂ desprendido) en suelos al final del cultivo. S: suelo; S+LP+E: suelo con 5% de lodo pirítico y encalado. Media ± EE, $n=5$. S: suelo; S+LP+E: suelo con 5% de lodo pirítico y encalado. NP: sin planta, se muestran las iniciales de cada especie vegetal. La respiración total (desprendimiento de CO₂) se muestra como incremento de los tiestos con planta respecto los tiestos sin planta para eliminar los efectos del desprendimiento de CO₂ procedente del carbonato residual en los suelos tratados con lodo pirítico.

Tabla 28. Estadística asociada a la Figura 38. Ss: sustrato; Esp: especie.

ANOVA 2F	β-glucosidasa	Δ Respiración	Ureasa	Fosfatasa ác.
Ss	<0,001***	0,331 ^{ns}	<0,001***	0,924 ^{ns}
Esp	0,040*	<0,001***	0,005**	<0,001***
Ss*Esp	<0,001***	0,036*	<0,001***	0,005**

Un incremento de la actividad microbiana de los suelos se ha asociado a un aumento de la calidad del suelo. Por tanto el cultivo vegetal produce una mejora en el suelo porque aumenta los niveles de actividades relacionadas con tres ciclos mayoritarios en suelos: C, N y P. La revegetación, independientemente de la acción directa sobre la disponibilidad de los elementos traza, puede ser una práctica de restauración básica en estos suelos degradados. El aumento de las actividades enzimáticas en la rizosfera de las plantas es un efecto conocido: la raíz vegetal exuda compuestos orgánicos que contienen C mayoritariamente. Los tejidos radiculares en degradación también suponen un aporte de C, N y P desde la planta al suelo. Todo ello hace que las poblaciones que controlan dichos ciclos estén más activas. La

rizosfera tiene poblaciones de microorganismos diferentes cualitativa y cuantitativamente que el suelo colindante sin raíz (Renella y col., 2004). Las actividades enzimáticas se inhiben en suelos por la presencia de metales pesados, pero el efecto de la rizosfera puede amortiguar dichos efectos tóxicos (Martínez-Iñigo y col., 2009). Los niveles de actividad enzimática y respiración en estos suelos son bajos, incluso para suelos mediterráneos degradados (García y col., 2000; García-Izquierdo y Hernández-Fernández, 2003). Si los comparamos con los niveles normales en suelos naturales, los niveles propuestos para β -glucosidasa (105), ureasa (1,4) y fosfatasa ácida (127) quedan lejos de los observados en el presente estudio. Los valores de β -glucosidasa, ureasa y fosfatasa ácida encontrados en nuestro estudio se encuentran en el rango de los descritos en la zona del vertido de Aznalcóllar por Hinojosa y col. (2004) para suelos contaminados pero no restaurados. Recordemos que la parcela de El Vicario (de donde se recogieron los suelos utilizados en el experimento) encaja perfectamente en dicha descripción, ya que permaneció inalterada tras retirar la capa superficial, utilizándose para la investigación científica. En el estudio de Hinojosa y col. (2004) se identifica que la contaminación causada por la presencia de lodo pirítico es el principal factor que provocó un descenso de la actividad enzimática. Dichos niveles de actividad enzimática continúan siendo bajos 8 años después, incluso tras un cultivo bajo condiciones semi-controladas. Sastre y col. (1996) encontraron niveles similares de actividad ureasa y fosfatasa en suelos mediterráneos que aparentemente no estaban afectados por contaminación. Si se comparan los valores obtenidos en el presente estudio con suelos contaminados por metales pesados del País Vasco (Epelde y col., 2008a-b), se observa una mucho mayor actividad β -glucosidasa, ureasa y fosfatasa en los suelos del norte de la Península Ibérica, probablemente influenciada por las diferencias entre un suelo desarrollado en condiciones atlánticas sobre el que crece un pastizal con respecto a un suelo incipiente desarrollado bajo condiciones mediterráneas y sin apenas cobertura vegetal. En uno de esos estudios, Epelde y col. (2008a) también identificaron incrementos de la actividad enzimática causados por el cultivo de la planta hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens*, lo que asociaron con mejoras de la salud del suelo derivadas de la fitorremediación. En nuestro caso también podemos asociar una mejora de la salud del suelo como reflejo de la eficacia de la fitorrecuperación de suelos, en este caso mediante fitoestabilización. De acuerdo con nuestros resultados, en un estudio similar reciente Epelde y col. (2009b) encontraron un incremento de la actividad enzimática como resultado del proceso de fitorremediación, lo que atribuyen al crecimiento vegetal y a la fitoextracción de los elementos tóxicos. Sin embargo la fitoextracción en nuestro estudio no fue relevante, por lo que es más correcto atribuir el efecto positivo al crecimiento vegetal y a la fitoestabilización durante el cultivo. Con respecto a la presencia de lodo pirítico, éste inhibió la actividad enzimática en el experimento como resultado del incremento del contenido de elementos traza y los cambios de pH inducidos, aunque la actividad fosfatasa apenas se vio alterada por la aplicación del lodo. Hinojosa y col. (2008) estudiaron la toxicidad del lodo pirítico sobre las enzimas de un suelo franco arenoso de la zona de Aznalcóllar, resultando una EC_{50} de 0,68; 2,74 y 1,89% para la β -glucosidasa, ureasa y fosfatasa ácida respectivamente. Dicha toxicidad inducida por el lodo revirtió parcialmente tras aplicar un encalado. La β -

glucosidasa mostró la mayor sensibilidad a la presencia de lodo y la menor recuperación de la actividad tras el encalado. En nuestro estudio, la actividad fosfatasa ácida fue la menos afectada por la aplicación de lodo, quizá por ser la menos sensible a la presencia de metales o por ser la que mejor se recuperó tras el encalado. La β -glucosidasa y la ureasa se vieron afectadas por la presencia de lodo pirítico pese al encalado. Aún en ese caso, la presencia de plantas mejoró la actividad microbiana del suelo.

Biomasa vegetal y transferencia de elementos traza a las plantas

La biomasa vegetal se vio afectada por la especie (Figura 39, Tabla 29), el sustrato de cultivo y su interacción ($P < 0,001$). Las partes aéreas de todas las especies sufrieron un descenso del crecimiento debido a la presencia de lodo. Como vimos en el apartado anterior, esta inhibición del crecimiento se produjo de forma drástica para los primeros meses, coincidentes con la acidificación del suelo. Después del encalado se comportaron las plantas de un modo parecido en ambos tipos de sustrato (Figura 36). En el experimento hidropónico (Capítulo 4) se vieron más afectadas las raíces que las partes aéreas por la presencia de As. Este es un fenómeno común ante cantidades tóxicas de elementos. Sin embargo, en el caso de ensayos sobre suelo el estudio de la raíz es complejo, ya que es difícil conseguir extraer las raíces más finas del suelo sobre el que viven. Por ello, cabe la duda de la representatividad de la fracción de raíz extraída de cada tiesto, ya que las raíces más finas y ramificadas pueden romperse y quedar en la fracción de suelo. En aquellos suelos más favorables (control) se observó una raíz más ramificada y fina, de modo que si esta fracción se pierde, se podrían distorsionar los resultados, cosa que no sucede con la parte aérea. En un estudio similar los resultados indicaron un aumento del crecimiento de las plantas por el aporte de residuo sobre un suelo básico, lo que fué atribuido a una movilización de micronutrientes como Cu y Zn que a pH básico se encuentran poco disponibles (Fellet y col., 2008).

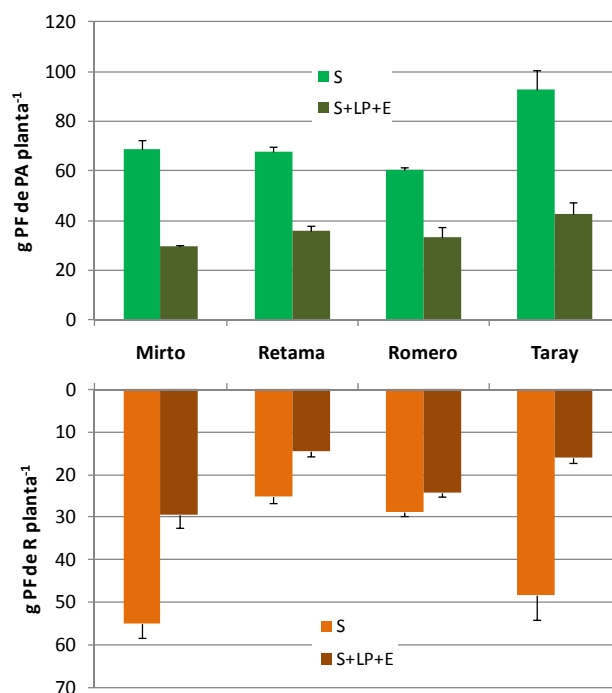


Figura 39. Biomasa (g PF raíz⁻¹; g PF parte aérea⁻¹) de las plantas arbustivas mediterráneas tras 20 meses de cultivo sobre suelo o suelo con 5% de lodo pirítico y encalado. Media \pm EE, $n=5$.

Tabla 29. Estadística asociada a la Figura 39. Ss: sustrato; Esp: especie.

ANOVA 2F	Raíz	Parte aérea
Ss	<0,001***	<0,001***
Esp	<0,001***	<0,001***
Ss*Esp	<0,001***	0,115 ^{ns}

Las concentraciones de elemento en planta tras 20 meses de cultivo muestran los efectos de la acidificación y movilización de elementos traza de los 3 primeros meses (Tabla 30). Así, los niveles de elementos traza en la parte aérea y la raíz de las plantas crecidas sobre suelo con lodo fueron significativamente mayores que sobre suelo control ($P < 0,001$). Ello sucede a pesar de que los niveles de elementos traza disponibles en el momento del muestreo final fueron similares entre ambos tipos de suelos (Figura 37). Se pone de manifiesto por tanto que las plantas son un registro continuo de los impactos que recibe el suelo, acumulado de los contaminantes a los que han estado expuestas a lo largo del tiempo. Cuando la disponibilidad de los contaminantes es variable a lo largo del tiempo, un muestreo instantáneo de suelo puede no reflejar dicha dinámica, pero un muestreo de planta completaría la información. En nuestro caso vemos que a pesar de niveles disponibles en suelo parecidos en el último muestreo, las plantas muestran una concentración mayor de elementos en el caso de los suelos con lodo, lo que nos haría pensar que en algún momento estuvieron más expuestas a dichos contaminantes. El momento en el que las plantas estuvieron expuestas a dosis altas de metales y As sucedió durante la acidificación del sustrato con

aplicación de lodo durante los 3 primeros meses de cultivo. Van Gestel (2008) describe como en muchas ocasiones la biodisponibilidad no puede ser predicha por la determinación de elemento extraíble por métodos de extracción química, si no se requiere de determinaciones en la biota para conocer la biodinámica de la absorción de los elementos traza. A pesar de que hubo diferencias significativas en la concentración de elementos traza en raíz y parte aérea debidas a la especie en todos los casos (como mínimo al $P < 0,05$, aunque la mayoría de ellas al $P < 0,001$), dichas diferencias no fueron en ningún caso destacables. Quizá lo más destacable sería la alta concentración de As en parte aérea de mirto y raíz de romero, la baja concentración de Cd en parte aérea de mirto o la alta concentración de Zn en la parte aérea de retama. La interacción especie-sustrato no fue significativa en los casos de la concentración de As y Cd en raíces y de Cd en parte aérea, poniendo de manifiesto que todas las especies se comportaron del mismo modo independientemente del sustrato. Respecto al factor de transferencia (TF, Tabla 31), disminuyó como regla general cuando aumentó la concentración de elementos tóxicos en el sustrato ($P < 0,001$), excepto en el caso del Cu, que permaneció inalterado en ambos sustratos. Es decir, en el suelo tratado con lodo se observó menor factor de transferencia para As, Cd y Zn, mientras en los suelos control se observó el menor TF para el Mn. Es un hecho común que cuanto más concentración de un elemento tóxico hay en el suelo, menor será el factor de transferencia (Hamon y col., 1999; Huang y col., 2006), ya que la mayoría de las plantas evita su toxicidad excluyéndolo. La especie vegetal fue una variable que influyó significativamente ($P < 0,001$) sobre el factor de transferencia. Destaca el TF alto para el As y bajo para el Cd en mirto, el TF alto para el Zn en retama y el alto TF para el Cd en retama y taray, pero todos los valores de TF para As, Cd, Cu y Zn fueron menores o mucho menores que 1. En un estudio de similares características con soja, sorgo, maíz y girasol por un período inferior a 2 meses (Fellet y col., 2008), la concentración alcanzada en la planta completa fue mayor como regla general que las encontradas en nuestro estudio, aunque el factor de transferencia (TF) calculado a partir de sus datos estuvo en el rango observado en nuestro estudio: el As se transfirió en menor magnitud que el Cu, siendo el Cd y el Zn los que mayor TF mostraron. Aunque los autores enfocan el anterior estudio hacia la fitoextracción, con tasas tan bajas de transferencia no parece la técnica más apropiada. En general, la disponibilidad de los metales en los residuos mineros no es elevada en comparación con el elemento total, lo que hace en muchos casos inviable aplicar una fitoextracción (Ernst, 2005; Robinson y col., 2006). En otro estudio similar en cuanto al sustrato y las condiciones de cultivo al que nos ocupa, Peñalosa y col. (2007) observaron en altramuces crecidos durante 1 mes en suelos de pH 8 y con un aporte del 5% de lodo concentraciones mayores de As en raíz y parte aérea, pero menores de Cd y Zn que las observadas en plantas arbustivas mediterráneas en el presente estudio. El Cu estuvo en el mismo rango. Las diferencias pueden explicarse parcialmente por el pH del suelo sobre el que se añadió el lodo: en este caso que nos ocupa el suelo es ligeramente ácido (pH 6), por lo que cabe esperar más intensa retención de As pero mayor movilidad de metales que en el de pH 8. En algunos casos se propone la adopción de medidas agronómicas como la fertilización para asistir a la planta durante la fitorremediación, sin embargo Fellet y col. (2008) encontraron efectos contradictorios, p. ej., en girasol aumentó la concentración de elementos traza en planta y en sorgo la disminuyó.

Tabla 30. Concentración de As, Cd, Cu, Mn y Zn en raíz y parte aérea de mirto, retama, romero y taray (R=raíz y PA=parte aérea). S: suelo; S+LP+E: suelo con 5% de lodo pirítico y encalado. *M.c.*: *Myrtus communis*; *R.s.*: *Retama sphaerocarpa*; *R.o.*: *Rosmarinus officinalis*; *T.g.*: *Tamarix gallica*. Media \pm EE, $n=5$.

Ss	Esp		$\mu\text{g g}^{-1}$ PS				
			As	Cd	Cu	Mn	Zn
S	<i>M.c.</i>	PA	0,65 \pm 0,05	0,04 \pm 0,02	5,98 \pm 0,35	59,5 \pm 4,8	26,7 \pm 0,7
		R	2,53 \pm 0,21	1,27 \pm 0,14	41,0 \pm 2,8	49,8 \pm 3,8	55,9 \pm 3,5
	<i>R.s.</i>	PA	0,36 \pm 0,03	0,55 \pm 0,08	10,0 \pm 0,6	45,7 \pm 3,6	82,1 \pm 7,3
		R	1,92 \pm 0,17	1,10 \pm 0,15	41,7 \pm 4,2	86,4 \pm 5,1	162,8 \pm 9,0
	<i>R.o.</i>	PA	0,34 \pm 0,03	0,14 \pm 0,02	12,5 \pm 0,7	34,1 \pm 2,5	46,5 \pm 3,5
		R	4,42 \pm 0,28	1,30 \pm 0,16	72,9 \pm 2,9	103,2 \pm 8,3	123,9 \pm 7,0
	<i>T.g.</i>	PA	0,36 \pm 0,05	0,44 \pm 0,02	12,1 \pm 0,7	30,8 \pm 2,9	29,6 \pm 2,0
		R	2,24 \pm 0,25	1,17 \pm 0,17	32,5 \pm 3,0	30,4 \pm 4,8	51,6 \pm 4,6
S+LP+E	<i>M.c.</i>	PA	0,77 \pm 0,05	0,32 \pm 0,05	8,6 \pm 0,4	398,1 \pm 27,7	105,9 \pm 5,0
		R	12,9 \pm 0,5	2,37 \pm 0,05	49,5 \pm 2,7	222,3 \pm 23,9	208,0 \pm 12,1
	<i>R.s.</i>	PA	0,37 \pm 0,03	1,19 \pm 0,13	14,9 \pm 0,8	341,7 \pm 22,8	214,9 \pm 12,1
		R	7,23 \pm 0,5	2,63 \pm 0,16	54,3 \pm 3,5	553 \pm 33	316 \pm 5
	<i>R.o.</i>	PA	0,43 \pm 0,05	0,43 \pm 0,12	11,9 \pm 0,5	132,3 \pm 5,7	114,9 \pm 3,8
		R	14,3 \pm 1,5	3,60 \pm 0,07	78,0 \pm 3,4	682 \pm 43	351 \pm 21
	<i>T.g.</i>	PA	0,44 \pm 0,04	0,94 \pm 0,03	14,6 \pm 0,7	142,3 \pm 11,7	84,9 \pm 3,8
		R	13,2 \pm 1,3	1,84 \pm 0,19	67,3 \pm 10,8	273 \pm 62	241 \pm 16
ANOVA	PA	Ss	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Esp	<0,001***	0,023*	<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Ss*Esp	0,006**	0,184ns	0,024*	<0,001***	0,008**
	Raíz	Ss	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Esp	0,022*	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Ss*Esp	0,638ns	0,220ns	0,003**	<0,001***	<0,001***

Tabla 31. Factor de transferencia (TF) del suelo a la parte aérea y relación $[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$ de los elementos traza. S: suelo; S+LP+E: suelo con 5% de lodo pirítico y encalado. M.c.: *Myrtus communis*; R.s.: *Retama sphaerocarpa*; R.o.: *Rosmarinus officinalis*; T.g.: *Tamarix gallica*. Media, $n=5$.

Ss	Esp		$\mu\text{g g}^{-1}$ PS				
			As	Cd	Cu	Mn	Zn
S	M.c.	TF	0,0083	0,027	0,062	0,104	0,085
		$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$	0,26	0,03	0,15	1,24	0,48
	R.s.	TF	0,0044	0,305	0,096	0,075	0,252
		$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$	0,19	0,54	0,25	0,54	0,51
	R.o.	TF	0,0042	0,084	0,121	0,061	0,147
		$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$	0,06	0,07	0,17	0,34	0,38
	T.g.	TF	0,0049	0,264	0,125	0,056	0,098
		$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$	0,18	0,12	0,39	1,03	0,60
S+LP+E	M.c.	TF	0,0032	0,178	0,074	1,03	0,274
		$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$	0,06	0,13	0,17	1,90	0,52
	R.s.	TF	0,0015	0,588	0,123	0,98	0,564
		$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$	0,05	0,43	0,28	0,62	0,68
	R.o.	TF	0,0017	0,206	0,104	0,48	0,310
		$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$	0,03	0,12	0,15	0,20	0,33
	T.g.	TF	0,0017	0,487	0,123	0,34	0,229
		$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$	0,04	0,36	0,27	0,60	0,35
ANOVA	TF	Ss	<0,001***	<0,001***	0,082ns	<0,001***	<0,001***
		Esp	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Ss*Esp	0,038*	0,340ns	0,064ns	0,002**	0,009**
		$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$ Ss	<0,001***	0,087ns	<0,002**	0,819	0,124ns
		Esp	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***
		Ss*Esp	0,002*	0,047*	0,000*	0,004**	<0,001***

Este capítulo resume un cultivo de invernadero a largo plazo que se ha realizado en paralelo a un estudio de campo de similares características. El aporte de lodo pretendía simular un evento de contaminación como el ocurrido en Aznalcóllar en el año 98. En Aznalcóllar había plantas creciendo que sufrirían un estrés parecido al inducido en este ensayo. El aporte de lodo ocasionó una acidificación y movilización de contaminantes que fue contrarrestada eficazmente con un encalado equivalente a 10 ton $\text{CaCO}_3 \text{ ha}^{-1}$, con lo que se inmovilizó el As, los metales del lodo y el Al y Mn liberados desde el suelo. Los suelos al final del cultivo mostraron niveles de elementos traza solubles que no fueron muy elevados, y las plantas tampoco concentraron dichos elementos hasta niveles tóxicos. El bajo factor de transferencia de los

elementos a las plantas y la baja concentración de elementos en parte aérea de las especies arbustivas mediterráneas estudiadas las hacen poco eficaces para fitoextracción, pero son buenas candidatas para la revegetación y fitoestabilización de suelos contaminados, especialmente si se tienen en cuenta sus efectos beneficiosos sobre el suelo. A pesar de que inicialmente las plantas se estresaron durante la fase de acidificación del sustrato con lodo pirítico, las medidas de gestión del suelo (encalado) y la aclimatación hicieron que finalmente pudieran desarrollarse en los suelos contaminados por un aporte de lodo pirítico. Además, el cultivo de dichas especies ha mejorado la calidad del suelo desde un punto de vista químico (aumento de C y N) y biológico (aumento de la actividad enzimática), sobre todo el cultivo de retama y mirto. El romero ha sido ya descrito como especie útil para fitoestabilizar suelos (Madejón y col., 2009), pero nuestro estudio demuestra que mejora menos la calidad del suelo que otras especies. En este tipo de suelos la fitoestabilización (asistida o no) parecen las opciones más realistas con el estado de conocimiento actual.

7. FITORREMEDIACIÓN DE ZONAS AFECTADAS POR CONTAMINACIÓN RESIDUAL ARSENOPIRÍTICA. ESTUDIO DE CAMPO.

Objetivo: Estudiar, en condiciones de campo, la movilidad de elementos traza en suelos contaminados por el vertido de Aznalcóllar, así como su transferencia a especies vegetales mediterráneas utilizadas en restauración ecológica de espacios degradados.

Materiales y Métodos

Diseño experimental

Este experimento se llevó a cabo en la parcela B2, que tiene una extensión total de 1000 m², situada en la zona de “El Vicario” (37°26'21"N; 06°13'00"W), en Aznalcóllar (Figura 40). Tras las actuaciones de limpieza urgente llevadas a cabo en la zona, la parcela no se alteró con el fin de ser usada para investigación.

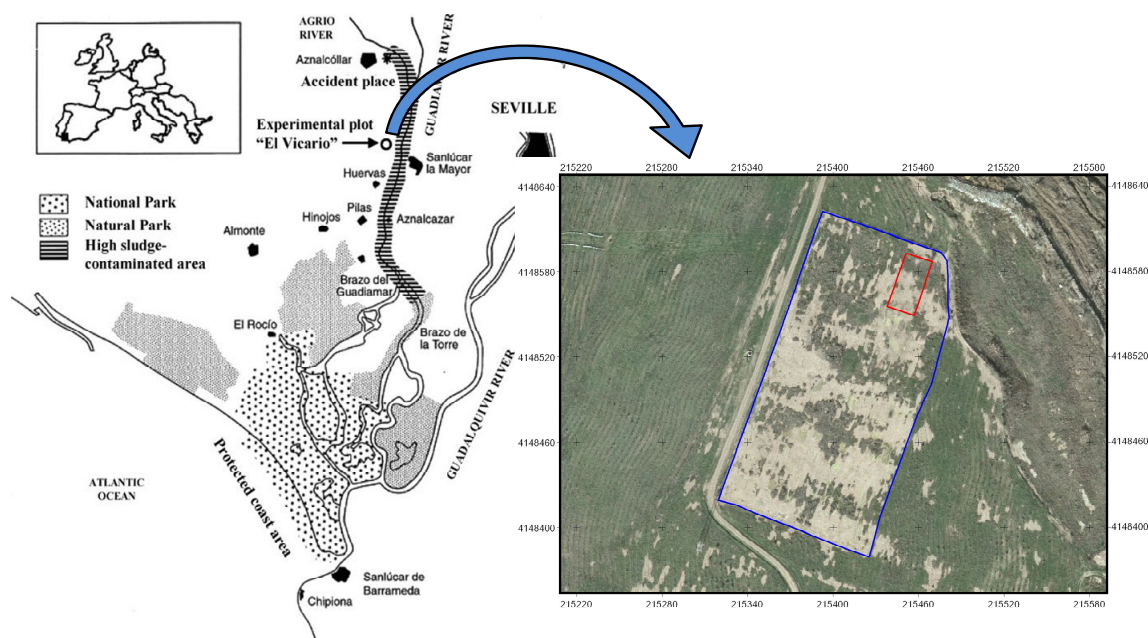


Figura 40. Localización de la parcela experimental El Vicario (en azul) y de la parcela B2 (en rojo), Sevilla.

Los suelos de la parcela han sido previamente descritos (Vázquez y col., 2006a) y sus características pueden resumirse como sigue: se trata de un suelo Typic Xerofluvent (Natural Resources Conservation Service, 1999) con una alta heterogeneidad espacial y un amplio rango de pH (2-7), bajo

contenido de carbonatos (generalmente $<0,1\%$), baja materia orgánica ($<2\%$) y bajo N ($<0,1\%$). La textura de los suelos de la parcela es franca o franco-arenosa.

Para el experimento se usaron plantas de un año de edad de especies frecuentemente utilizadas en revegetación de suelos: *Myrtus communis* L., *Retama sphaerocarpa* L., *Rosmarinus officinalis* L. y *Tamarix gallica* L., cedidas por la Junta de Andalucía (invernadero de San Jerónimo, Sevilla). Se seleccionaron ejemplares de características uniformes en cuanto a talla (15-30 cm de altura) para el ensayo. Cabe destacar que, en otro estudio llevado a cabo en la zona, Domínguez y col. (2008) identificaron el taray como *T. africana*. Sin embargo, los usados en nuestro estudio serán ejemplares de *T. gallica*, ya que sus inflorescencias tenían un calibre menor de 5 mm. La diferencia entre ambas especies es sutil, solamente diferenciadas en el tamaño de la inflorescencia.

Como ya se ha descrito, la parcela experimental mostró una elevada heterogeneidad e incluso algunas manchas de lodo estaban todavía visibles al inicio del experimento. Por ello la parcela se subdividió en subparcelas de 25 m², que se agruparon según su pH ($\text{pH} < 5$ y $\text{pH} > 5$) y se escogieron 8 de cada grupo para el ensayo. Cada subparcela se dividió en 4 cuadrados (unidades de siembra) de 1,5 x 1,5 m con un pasillo en los bordes de 0,5 m. En cada unidad se transplantaron 16 plantas (una alta densidad) con una distancia entre cada una de 50 cm. La Figura 41 esquematiza todo el diseño experimental que se ha detallado hasta ahora.

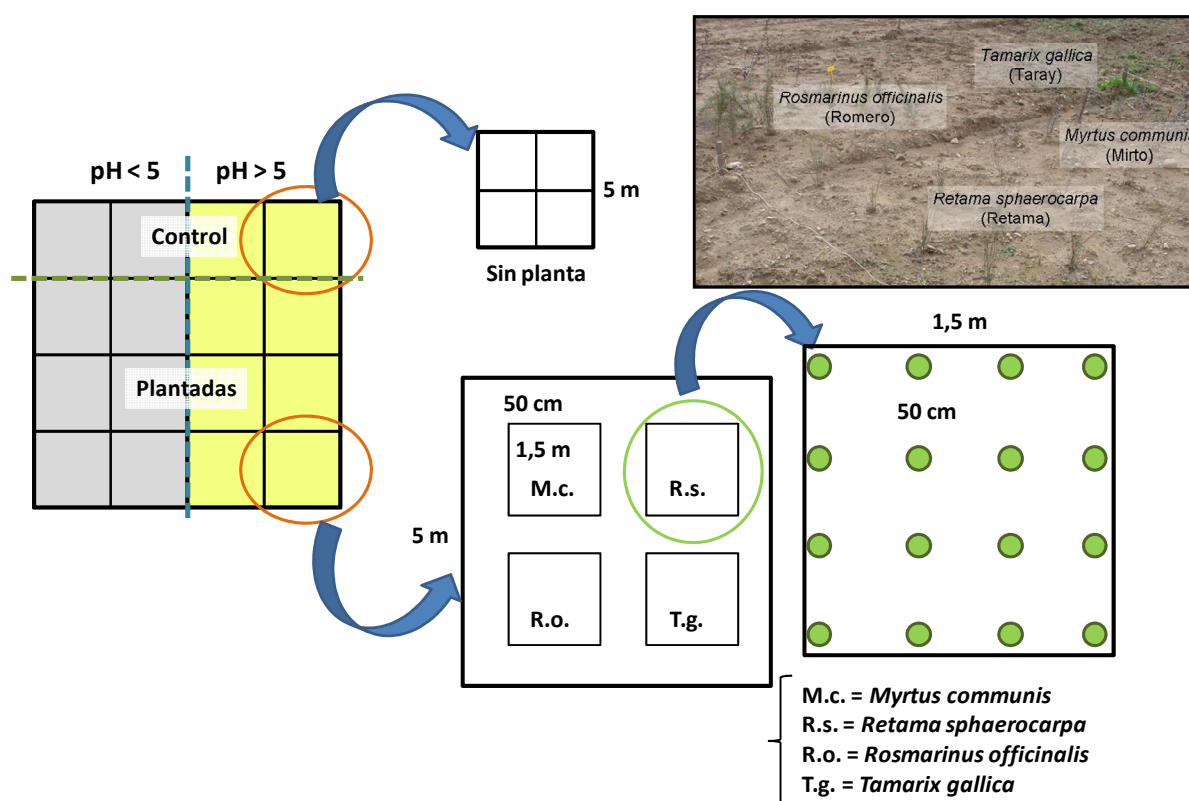


Figura 41. Detalle del diseño experimental en subparcelas y unidades dentro de la parcela B2. Arriba a la derecha, parcela sembrada de todas las especies vegetales (primavera de 2006).

El experimento comenzó en Diciembre de 2005 y acabó en Diciembre de 2007. Las plantas se mantuvieron bajo las condiciones ambientales de la zona, sin ninguna medida de gestión agrícola durante el ensayo. Después de 1 y 2 años, se calculó el porcentaje de supervivencia en comparación con las insertadas inicialmente, en invierno de 2006 y de 2007 respectivamente. Se consideraban plantas supervivientes aquellas que permanecían insertadas en el terreno y tenían síntomas de actividad biológica. Paralelamente a las parcelas plantadas, se mantuvieron unas parcelas control sin plantas, a las que se realizó el muestreo de suelos.

Muestreo de suelo y de plantas

En aquellas unidades con planta, se muestrearon tanto el suelo como la planta (raíz y parte aérea). La raíz fue sacada cuidadosamente con una pala, cogiéndose suelo que estaba en contacto con dichas raíces. En las parcelas control, que no tenían plantas, se muestreó el suelo de los primeros 5-30 cm de suelo. Las raíces se limpiaron de partículas de suelo manualmente y se lavaron con agua del grifo. Luego, tanto raíces como partes aéreas se sumergieron 1 min en agua del grifo y otro en abundante agua destilada. El material vegetal se secó a 60 °C en estufa durante 3 días y se molió. Los suelos se secaron durante 7 días en el invernadero de la UAM, después se desagregaron y tamizaron a < 2 mm.

Procedimientos analíticos

El pH se midió siguiendo el protocolo oficial del Ministerio de Agricultura (MAPA, 1994), en una suspensión 1:2,5. La concentración total de elementos en suelo se realizó mediante la digestión de 0,5 g de suelo en 6 mL H₂O, 6 mL y 4 mL HNO₃:H₂O₂ en autoclave (Capítulo 3), enrasando con agua mili-Q a 50 mL. El elemento extraíble se determinó de este modo: a 1,5 g de suelo se le añadieron 15 mL de sulfato amónico 0,1 M, se agitó en agitador de vaivén a 180 rpm durante 4 horas, se filtró, se añadieron 0,1 mL de HNO₃ y se conservó en frigorífico.

Para la mineralización ácida de las plantas se añadieron a 0,5 g de parte aérea 10 mL de agua mili-Q, 3 mL de ácido nítrico, y 2 de agua oxigenada. Se digirió a 125 °C y 1,5 kPa en autoclave durante 30 minutos, se filtró y se enrasó con agua mili-Q a 25 mL (Capítulo 3).

Los metales en los extractos de suelo y planta y en las aguas se determinaron por Espectroscopia de Absorción Atómica y el As se determinó mediante Fluorescencia Atómica (Vázquez y col., 2008a).

Para el fraccionamiento del As tanto en parcelas con pH<5 como con pH>5, se sometió a las muestras de suelo a una extracción secuencial específica de As, siguiendo el procedimiento descrito en los Materiales y Métodos del Capítulo 6 (Wenzel y col., 2001).

Procesado de datos

Los datos se procesaron con ayuda de los programas Excel® y SPSS®. Se utilizó un ANOVA de dos factores para evaluar el peso de los factores (pH del suelo y especie vegetal) que influían en la supervivencia. El factor de transferencia (TF) se calculó mediante la relación $[ET]_{PA}/[ET]_{total\ suelo}$ (ET: elemento traza). La transferencia de la raíz a la parte aérea se evaluó por la relación de las concentraciones en la parte aérea y en la raíz: $[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$.

Resultados

Suelos de la parcela

El pH y los niveles de elementos traza totales en los suelos de la parcela se detallan en la Figura 42. Las subparcelas se dividieron en dos grupos: los suelos claramente ácidos, con pH menor de 5, mostraron un rango entre 2,9 y 4,8, mientras los cercanos a la neutralidad, con pH mayor de 5, estuvieron entre 5,2 y 8,3. Se incluyó el aluminio porque es un elemento que se moviliza a bajo pH (normalmente menor de 4) y puede ser tóxico para las plantas. Las concentraciones totales de todos ellos son bastante parecidas entre los dos grupos de suelos (pH<5 y >5). La concentración de Al y Cd es parecida en ambos grupos, mientras que la de Cu parece mayor en las cercanas a la neutralidad, pero con unas diferencias poco destacables. Las medias para Al, Cd y Cu rondaron 2%, 1,2 y 22 mg kg⁻¹ en suelo respectivamente. Las únicas diferencias reseñables son las correspondientes al As, que es más abundante en suelos más ácidos, y al Zn, que abunda en suelos cercanos a la neutralidad. Para el Zn se obtuvieron unas medias de 252 y 312 mg kg⁻¹ respectivamente para los ácidos y los neutros, mientras para el As fueron de 87 y 46 mg kg⁻¹. En algunos de los casos, la mediana fue notablemente menor que la media (dato no mostrado), lo que indica la presencia de valores atípicamente altos de elementos traza en alguna de las muestras.

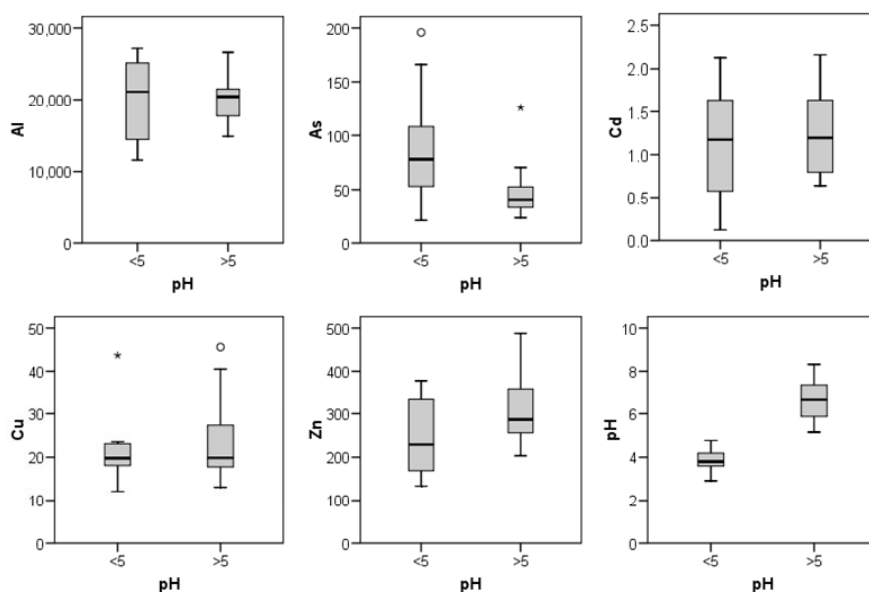


Figura 42. Contenidos totales (mg kg⁻¹) de Al, As, Cd, Cu y Zn así como pH en suelos de la parcela B2 en la finca “El Vicario”.

Los niveles de elementos disponibles en las parcelas se detallan en la Figura 43. De nuevo la mediana fue menor que la media del elemento en casi todos los casos (excepto para el Al en las parcelas cercanas a la neutralidad). Los niveles de Zn y de Al alcanzaron valores mucho mayores que para los otros elementos. Todos los metales muestran una mayor concentración disponible en las parcelas ácidas en general, sin embargo la concentración de As disponible muestra valores iguales o mayores en las parcelas cercanas a la neutralidad, a pesar de que el valor total en suelo era menor en esas parcelas que en las ácidas (Figura 32).

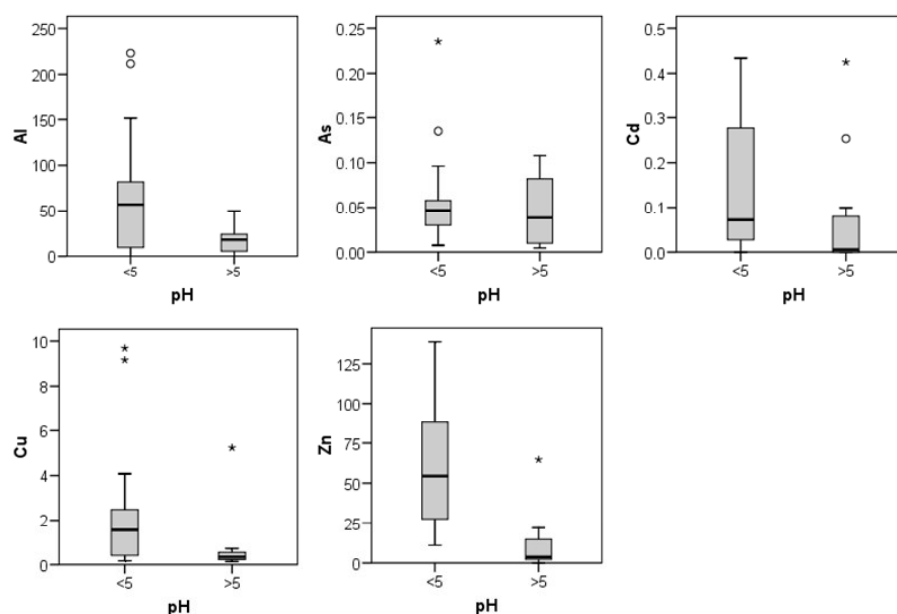


Figura 43. Concentración disponible (mg kg^{-1}) de Al, As, Cd, Cu y Zn en suelos de la parcela B2 en la finca “El Vicario” agrupados en función del pH.

Los datos del porcentaje de elemento disponible con respecto al total revelan que los elementos mostraron muy distinta extractabilidad en función de su naturaleza y el pH del suelo (Figura 44). El único elemento aniónico, el As, mostró la menor extractabilidad, mientras el Al, a pesar de ser catiónico, muestra baja disponibilidad también. El Zn mostró la mayor solubilidad, principalmente a pH menor de 5. A este respecto, el porcentaje de metal extraíble fue mayor cuando el pH era menor de 5, mientras que el As parece mostrar el patrón contrario, a pH cercano a la neutralidad el porcentaje de As extraíble aumentó.

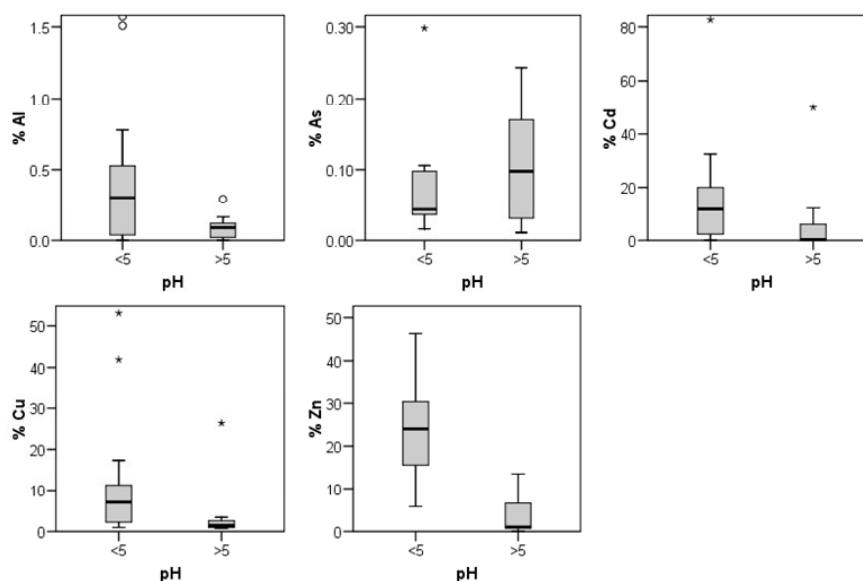


Figura 44. Porcentaje (%) de elementos traza disponibles en relación al total en el suelo.

Para explicar la disponibilidad (Ext= extraíble con sulfato amónico) de los elementos traza en los suelos se realizó un análisis de regresión lineal que comprendía dos variables que influyen frecuentemente en su comportamiento: pH y contenido total (T= total). Los resultados de dichos análisis se detallan a continuación (n= 38):

$$[Al]_{Ext} = 187 - 17 \cdot pH - 0,003 \cdot [Al]_T; 0,56; P < 0,01.$$

$$[Cd]_{Ext} = 0,27 - 0,05 \cdot pH + 0,07 \cdot [Cd]_T; r=0,52; P < 0,01.$$

$$[Cu]_{Ext} = 4,73 - 0,63 \cdot pH - 0,003 \cdot [Cu]_T; r=0,42; P < 0,01.$$

$$[Zn]_{Ext} = 92 - 26 \cdot pH + 0,23 \cdot [Zn]_T; r=0,84; P < 0,001.$$

Ello implica que la concentración de metales extraíbles en estos suelos puede ser explicada de forma lineal a partir del contenido total de elemento y el pH. En los casos de Zn y Cd extraíbles ambas variables mostraron una elevada significación en el modelo, mientras que para el Cu y el Al la mayor significación se obtuvo para la variable pH.

El modelo de regresión lineal anterior no fue significativo para el As extraíble, por lo que debe haber otros factores que expliquen su disponibilidad. Se realizó una extracción secuencial de un suelo de cada tipo para estudiar el comportamiento del As en estos suelos. Los resultados se detallan en la Tabla 32. Corroborando lo observado en la figura anterior, el porcentaje de As lábil en el suelo fue mayor para el suelo con pH más alto, lo que se refleja en el mayor porcentaje asociado a las dos primeras fracciones. Es de destacar que la fracción extraíble en el paso 1 fue casi 5 veces mayor en el caso del suelo de pH>5. Si comparamos los niveles de As extraíble de la Figura 44 y los de la fracción 1 de la tabla 32, vemos como dicha fracción es mayor en el caso de la extracción secuencial que en el método de extracción de elemento disponible. Esta diferencia es debida a que la extracción de elemento disponible descrita por Vázquez y col. (2008a) se realiza con una relación suelo:extractante de 1:10, mientras la extracción secuencial utiliza una relación 1:25 (Wenzel y col., 2001). Como regla general, a medida que aumenta la proporción de

extractante respecto a la de suelo, aumenta la cantidad de elemento extraído (Sauvé, 2001). El papel de los óxidos de Fe en la retención de As fue importante en ambos suelos, incluso a pesar del pH bajo de uno de ellos (en torno a 3). Entre el 45-60% del As en el suelo estaba por tanto retenido en las fracciones 3 y 4. Por último, la fracción residual fue también importante en ambos suelos. Sin embargo, en el de mayor pH fue menor (30%) que en el de pH<5 (46%).

Tabla 32. Porcentaje de As asociado a cada fracción en un suelo de cada tipo estudiado. Media, $n=2$.

	F1	F2	F3	F4	F5	Total
	%					mg As kg ⁻¹
pH=3,0	0,11	8,8	14,3	31,2	45,6	148
pH=6,4	0,50	10,2	15,8	44,1	29,8	55

Plantas cultivadas en la parcela

La supervivencia vegetal se determinó en dos momentos a lo largo del ensayo. Durante el primer año no fue posible distinguir aquellas plantas que estaban en estado de letargo de otras que se encontraban muertas pero aún erguidas, mientras el segundo todas las plantas que permanecían en la parcela mostraban evidencias de supervivencia. Las plantas tuvieron que resistir además de las inclemencias climáticas de la zona (inundaciones, veranos calurosos y secos), competencia con la maleza y la presencia de animales (caballos, conejos...) que arrancaban algunos ejemplares. La supervivencia decreció a lo largo del tiempo (datos no mostrados). Al final de los 2 años de permanencia, la supervivencia no fue muy alta en general, pero algunas especies se establecieron con cierto éxito (Tabla 33).

Tabla 33. Porcentaje de supervivencia de las plantas en la parcela experimental 2 años después de la plantación. Media \pm EE, $n=8$.

Especie (Esp)	Supervivencia vegetal (%)	
	pH<5	pH>5
<i>Myrtus communis</i>	13,8 \pm 8,9	0,8 \pm 0,9
<i>Retama spaherocarpa</i>	23,8 \pm 8,7	34,4 \pm 9,0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	10,2 \pm 4,9	27,8 \pm 6,2
<i>Tamarix gallica</i>	3,1 \pm 1,4	16,7 \pm 6,8
	pH	Esp pH*Esp
ANOVA	n.s.	** *

La retama se estableció exitosamente en ambos tipos de parcelas, mientras el romero lo hizo en las cercanas a la neutralidad, disminuyendo su éxito en las ácidas. El mirto se estableció mejor en las parcelas ácidas, donde tuvo menos competencia con otras plantas, siendo testimonial su presencia en el

otro grupo de subparcelas, al contrario que sucedió con el taray. La supervivencia de taray no fue elevada, pero los ejemplares que consiguieron arraigar crecieron de forma espectacular en algunos casos.

La concentración de Al, As, Cd, Cu y Zn se muestran en la Tabla 34. Los niveles de metales y As son bastante homogéneos entre especies y tipos de suelos, aunque cabe destacar que los niveles de Al, As, Cd y Zn en planta son ligeramente superiores en las parcelas ácidas. Los niveles de As en la parte aérea de mirto son también destacables.

Tabla 34. Concentración de elementos traza ($\mu\text{g g}^{-1}$) en parte aérea (PA) y raíz (R): Al, As, Cd, Cu y Zn. Media (rango), $n=3-8$. M.c.: *Myrtus communis*; R.o.: *Rosmarinus officinalis*; R.s.: *Retama sphaerocarpa*; T.g.: *Tamarix gallica*. n.d.: no detectable; n.a.: no analizado, la planta superviviente no fue muestreada.

		Al	As	Cd	Cu	Zn
pH<5						
M.c.	PA	226 (169-333)	2,56 (1,60-4,57)	0,29 (0,23-0,41)	6,3 (5,4-8,3)	196 (84-290)
	R	96 (35-205)	1,67 (0,64-3,82)	0,57 (n.d.-1,22)	17,0 (6,8- 35,5)	100 (61-141)
R.s.	PA	137 (81-182)	1,53 (0,46-2,12)	0,17 (0,05-0,38)	8,4 (6,4-11,7)	149 (90-249)
	R	186 (47-398)	4,99 (3,98-5,76)	0,53 (0,24-0,75)	11,8 (10,2-14,3)	172 (133-196)
R.o.	PA	177 (139-202)	0,78 (0,74-0,83)	0,15 (0,12-0,19)	13,1 (11,3-15,6)	90 (82-100)
	R	118 (93-205)	1,57 (1,23-1,83)	0,16 (n.d.-0,29)	12,8 (9,1-19,2)	54 (46-68)
T.g.	PA	147 (118-183)	0,79 (0,50-0,93)	0,32 (0,18-0,59)	9,2 (8,9-9,4)	114 (71-196)
	R	15 (6,8-44)	1,84 (0,73-3,82)	0,04 (n.d.-0,11)	6,3 (5,1-7,1)	56 (33-85)
pH>5						
M.c.	PA	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	R	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
R.s.	PA	153 (123-180)	0,82 (0,66-0,95)	0,07 (0,04-0,10)	6,4 (4,7-9,0)	61 (44-73)
	R	28 (4,1-76)	0,84 (0,48-1,56)	0,33 (0,02-0,67)	8,4 (5,8-9,6)	92 (32-133)
R.o.	PA	148 (83-196)	0,67 (0,43-0,83)	0,19 (0,07-0,34)	11,9 (10,4-14,4)	66 (42-88)
	R	55 (6-136)	1,16 (0,37-2,97)	0,12 (0,06-0,34)	14,1 (8,6-20,8)	32 (20-50)
T.g.	PA	134 (103-170)	0,71 (0,43-0,83)	0,31 (0,20-0,41)	10,3 (8,2-12,3)	43 (33-52)
	R	54 (23-83)	1,13 (0,70-1,84)	0,16 (n.d.-0,42)	10,2 (9,0-14,4)	50 (29-83)

La transferencia de metales y As a la parte aérea fue eficiente en algunas plantas, observándose una relación $[\text{ET}]_{\text{PA}}/[\text{ET}]_{\text{raiz}}$ para algunos casos mayores de 1 (Tabla 35). Es de destacar que el Al en suelos de pH>5 se transloca muy eficientemente a parte aérea cuando su disponibilidad es baja, mientras que es retenido parcialmente en raíz cuando el pH es ácido y su disponibilidad aumenta, lo que puede convertir al Al en elemento tóxico. Los factores de transferencia son en todos los casos menores de 1, siendo los más bajos los de Al y As.

Tabla 35. Relación $[ET]_{PA}/[ET]_R$ y factor de transferencia (TF) para Al, As, Cd, Cu and Zn en plantas cultivadas en la parcela experimental. Media, n=3-8. M.c.: *Myrtus communis*; R.o.: *Rosmarinus officinalis*; R.s.: *Retama sphaerocarpa*; T.g.: *Tamarix gallica*. n.a.: no analizado.

	$[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$					TF				
	Al	As	Cd	Cu	Zn	Al	As	Cd	Cu	Zn
pH<5										
M.c.	2,35	1,53	0,51	0,37	1,96	0,009	0,026	0,19	0,29	0,73
R.s.	0,74	0,31	0,33	0,71	0,87	0,006	0,018	0,10	0,45	0,46
R.o.	1,50	0,50	0,95	1,02	1,68	0,007	0,016	0,10	0,53	0,32
T.g.	2,48	0,43	8,80	1,46	2,04	0,010	0,008	0,58	0,46	0,57
pH>5										
M.c.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
R.s.	5,43	0,98	0,20	0,76	0,66	0,007	0,027	0,05	0,37	0,17
R.o.	2,69	0,98	0,89	0,85	2,10	0,007	0,017	0,18	0,40	0,25
T.g.	3,98	0,63	1,96	1,01	0,86	0,007	0,021	0,24	0,47	0,15

Discusión

Los valores de elementos traza determinados en los suelos de la parcela del ensayo entran dentro de los rangos determinados por nuestro grupo en anteriores ocasiones (Hevia, 2007), y los de otros valores descritos para suelos de la zona (Dominguez y col., 2008). Si comparamos los valores totales (Figura 42) con la bibliografía (Cabrera y col., 1999), podemos observar como As y Zn superaron claramente los niveles de suelos no afectados de la zona, que podrían considerarse como fondo geoquímico de los suelos. Sin embargo el Cd y el Cu están en el rango de los suelos no afectados por el vertido en 1998. En las parcelas ácidas se supera el valor máximo analizado por Cabrera y col. (1999) en suelos no afectados en el 85, 43 y 27% de los casos respectivamente para As, Cd y Zn, mientras para las parcelas con pH>5, lo hace en el 36, 43 y 50% de los casos para los mismos elementos. Todos los valores de As, Cd, Cu y Zn en ambos tipos de parcelas se encontraron en el rango descrito por los mismos autores para suelos de la zona afectados por el vertido de Aznalcóllar. Aguilar y col. (2004a) propusieron como niveles máximos permitidos en áreas naturales para la zona estudiada de 1000, 500, 100 y 15 mg kg⁻¹ de Zn, Cu, As y Cd en suelos respectivamente. Solamente en el caso del As se superaron dichos valores, concretamente en un 30% de los suelos con pH<5 y en un 5% de los suelos con pH>5 se sobrepasaron los 100 mg As kg⁻¹. En cambio, los valores de As y Zn en los suelos estudiados superaron en mayor medida los umbrales superiores de concentración en suelos (de 20 y 400 mg kg⁻¹ respectivamente) para ser considerados tóxicos según Ross (1994). Por su parte, la Junta de Andalucía fijó unas concentraciones límites en los suelos afectados por el

accidente minero, en suelos no sensibles dichos valores fueron de 1200, 10, 500 y 100 para Zn, Cd, Cu y As respectivamente (BOJA, 1999). Los niveles de elementos disponibles también se encuentran en el rango de los valores observados en experiencias previas usando el mismo agente extractante con suelos de la misma zona (Hevia, 2007; Capítulo 6), los valores de Cd estuvieron en muchos casos cercanos al límite de detección, principalmente en las subparcelas menos ácidas. Los valores de Zn extraíble son altos en algunos casos, a pesar de que los niveles totales no son elevados comparados con otros suelos contaminados (Capítulo 8; Beesley y col., 2010), y los de As son menores que los observados en Bustarviejo (Capítulo 8). Los de Cu están en un rango parecido a los de Bustarviejo, pero en ninguno de ambos caso llegan a niveles de Cu total como los observados en otros suelos (Clemente y col., 2008). En este experimento se ha corroborado indirectamente un hecho que había sido observado en un trabajo previo de nuestro grupo en la misma parcela (Hevia, 2007). Los suelos de la parcela experimental habían mostrado un descenso del contenido total de algunos metales y As a lo largo del tiempo (2000-2006). Ello se atribuía a una lixiviación progresiva de la fracción más soluble de elementos al subsuelo, que no se había controlado. En el caso de los metales se observa que los de pH<5 poseen un contenido de metales igual o incluso menor que los suelos de pH>5 (Figura 42). Sin embargo en estudios realizados durante los primeros años después del accidente, se determinó que los suelos de la misma zona con un pH bajo tenían un alto contenido en metales (Aguilar y col., 2004a). Esto es debido a que la presencia de arsenopirita aporta metales y capacidad de acidificar los suelos. Sin embargo, la disponibilidad de los metales en los suelos ácidos es mayor (Figura 43), por lo que se pueden lavar más fácilmente. Como resultado, parece que la oxidación de la piritita ha provocado un lavado de metales de los suelos ácidos hasta el año 2007, mientras en los de mayor pH los niveles han permanecido más constantes porque el lavado ha sido menos intenso. El fenómeno ocurrido en suelos ácidos podría ser considerado atenuación natural en los suelos, pero habría que probar que los suelos colindantes y las aguas no han sido impactados por este lavado para que sea considerado realmente una atenuación natural efectiva y no una dispersión incontrolada de la contaminación. El efecto contrario se produce para el As, su disponibilidad no muestra un patrón claro, pero parece más disponible en los suelos de pH>5, que son los que muestran un menor contenido total, indicando de nuevo un posible lavado/migración también de las fracciones solubles de los elementos traza a largo plazo desde la parcela hacia áreas colindantes u otros medios. Cabe decir a este punto que los valores de metales medidos en nuestro estudio son menores que los analizados por Clemente y col. (2006b) en el año 2000 y que los descritos por Madejón y col. (2006a) para el año 2002 en unas parcelas colindantes dentro de la finca El Vicario. En un estudio realizado por Aguilar y col. (2004a) se describe como la liberación de los metales causada por la oxidación de la piritita fue rápida para Cd, Cu y Zn y un poco más lenta para el As. Resultados similares obtuvieron Álvarez-Ayuso y col. (2008) para suelos de la misma zona, que describen un grupo de metales con menor movilidad, formado por As, Sb, Pb, Tl y Hg, y otro con elementos de mayor movilidad y facilidad para lixivarse, entre los que estaban Cd, Zn, Ni y Cu. Fernández-Gálvez y col. (2007) modelizaron la infiltración en suelos de El Vicario, encontrando que el Zn era el contaminante de mayor tasa de infiltración, hasta de 1,2 g Zn año⁻¹ m⁻². Finalmente, Simón y col

(2009) encontraron recientemente una movilización del Zn y el As con el tiempo (1998-2004) de la capa de suelo superficial (hasta 10 cm) a una zona intermedia (10-30 cm), pero sus concentraciones no se vieron alteradas con el paso del tiempo en la capa más profunda estudiada (30-50 cm). Ello podrá indicar una falta de movilidad de los elementos tóxicos en profundidad del perfil del suelo, pero son necesarios estudios más pormenorizados para poder constatar la peligrosidad de los lixiviados superficiales y subterráneos que se produzcan desde las capas más contaminadas por elementos traza.

El patrón de disponibilidad de los elementos traza observado en este estudio de campo es similar al observado en otros experimentos del presente documento (Capítulos 5 y 6), y es también consistente con otros estudios realizados con suelos (Beesley y col., 2010; Madejón y Lepp, 2007; Lepp y Madejón, 2007). Así, la movilidad del As en suelos es baja, la de Cu es moderada y las de Cd y Zn son las más elevadas. La del aluminio es muy baja excepto en aquellos suelos con un pH por debajo de 4 (Delhaize y Ryan, 1995; Juárez Sanz y col., 2006). En los suelos se realizó para cada elemento un análisis de regresión lineal del elemento extraíble explicado por el elemento total y el pH. Estas dos variables son claves explicando la movilidad y disponibilidad de elementos traza en suelos (Adriano, 2001), junto a otras como el contenido en materia orgánica, la textura o el contenido en óxidos. En los suelos de nuestra subparcela en "El Vicario" el pH y la concentración total varían entre un amplio rango, por lo que cabe esperar que su influencia sea mayor sobre la variabilidad de movilidad de los elementos traza que la de las otras variables, que se encuentran en un rango menos amplio (una textura franco-arenosa en toda la parcela con entre 1-2% de materia orgánica, 0,05-0,07% de N y 2-5% para el Fe, 1,2-2,7% de Al) (datos no mostrados, determinados en Octubre de 2005). Las regresiones corroboran que la fracción disponible de metales en estos suelos se puede explicar parcialmente por el pH y el contenido total, pero no así la del arsénico, que es más complicada ya que a pH bajos (<3,5) y altos (>6,5) muestra un repunte en la movilidad. Probablemente eso sea debido, a pH alto, a una disminución de lugares de retención y la presencia de OH⁻ que desplacen al arseniato, y en el caso contrario (pH bajo) podría deberse a la liberación de As de la arsenopirita durante su oxidación y a la formación de H₃AsO₄. Muchos autores han descrito que a pH alto el As es más soluble, pero tanto este como otros estudios (Aguilar y col., 2007a) aconsejan que dicha generalidad se aplique con cuidado, ya que en terrenos piríticos el As parece ser retenido o coprecipitar en algún compuesto de Fe, sales de sulfatos o carbonatos (García y col., 2009; Zhang y Selim, 2008) bajo pH neutro-básico. Los altos contenidos de Fe en el suelo, junto a las evidencias de oxidación del lodo, sugieren que estos suelos tengan un alto contenido de óxidos susceptibles de retener As. En cualquier caso, la solubilidad del As en suelos con buena aireación suele ser baja (Wenzel y col., 2002; Beesley y col., 2010; Capítulo 8). Para ahondar en la geoquímica del As en estos suelos se realizó un fraccionamiento de acuerdo al método de Wenzel y col. (2001). En él se puso de manifiesto el papel principal de las fracciones asociadas a óxidos de Fe y Al en la retención de As, hasta un 45-60% del As se encontró en esas fracciones. También mostró la mayor movilidad del As en suelos de mayor pH, hasta un 10,7% del As estuvo en las fracciones F1 y F2, que en los más ácidos, donde solo estuvo el 8,9%. Los suelos ácidos mostraron una mayor proporción de As residual (F5), indicativo de que el As estaría parcialmente aún en forma de arsenopirita. A grandes

rasgos, los resultados de la extracción secuencial son bastante consistentes con los observados en otras zonas de minería pirítica contaminadas por As (Conesa y col., 2008; Capítulo 8). Esto indicaría que en este tipo de terrenos el As se encuentra de forma poco disponible porque se retiene eficazmente en el suelo. Sin embargo, como veremos más adelante (Capítulo 8), en Bustarviejo un bajo porcentaje en la F1 de la extracción secuencial estuvo asociado con unas aguas cargadas de As, por lo que no se puede afirmar tajantemente que una baja solubilidad del As en los suelos asegure niveles en las aguas locales bajos. Sí se puede confirmar en cambio el papel primordial de los (oxihidr)óxidos de Fe y Al controlando la extractabilidad del As en estos suelos (F3 y F4, Wenzel y col., 2001), además de una reserva de As como arsenopirita susceptible de ser oxidado todavía. La proporción de As asociada a sulfuros (F5) es especialmente destacable en los suelos ácidos, poniendo de manifiesto que aún pueden producirse fenómenos de acidificación en los suelos de El Vicario que liberen el metaloide.

Para las plantas, se utilizó una alta densidad de plantación y no se aportó ninguna asistencia de prácticas agronómicas (de riego, fertilización, manejo del terreno...), en esas condiciones la supervivencia media fue menor del 40%. La supervivencia vegetal demostró diferencias significativas entre especies y tipos de suelos. Así la retama fue la especie que demostró la mayor supervivencia en ambas, las más y las menos ácidas. El romero y el taray demostraron una moderada supervivencia en condiciones cercanas a la neutralidad. Cabe destacar que en parcelas con pH menor de 3,5 ni romero ni taray sobrevivieron, pero sí lo hicieron retamas y mirtos. El mirto es un caso peculiar: solo se desarrolló en aquellos sitios sin competencia de hierbas silvestres que crecen espontáneamente en la zona. Por ello mostró una moderada supervivencia en parcelas con pH bajo, entre 4 y 3, al no tener competencia. Dichas especies han sobrevivido a lo largo del Corredor Verde tras ser replantadas por la Junta desde 1999, aunque no nos consta la presencia/supervivencia de mirto en dichas reforestaciones. Dicha influencia negativa de las malas hierbas sobre la supervivencia y desarrollo de arbustos mediterráneos en reforestación ya ha sido identificada en estudios previos (Espigares y col., 2004).

Ninguna de las plantas mostró una especial habilidad para acumular los elementos traza estudiados, mostrando factores de transferencia menores o mucho menores de 1. El orden que siguió el factor de transferencia fue en líneas generales $Al < As < Cd \sim Cu < Zn$. Dicho orden es bastante similar al observado por Domínguez y col. (2008). Por tanto, ninguna de las especies puede ser utilizada en fitoextracción, pero podrían ser de utilidad en fitoestabilización porque no acumulan elementos tóxicos en partes susceptibles de causar riesgo para la cadena trófica. Es importante tener en cuenta que muchos de los terrenos que fueron afectados por el vertido tienen fundamentalmente valor desde los puntos de vista agrícola y ambiental. La fitoextracción en estos suelos es en principio inviable para toda la extensión del terreno y poco sostenible a largo plazo, por ello la Junta utilizó otras estrategias de fitogestión del terreno. Nuestros datos avalan que las elegidas fueron medidas correctas, como datos de otros estudios anteriores (Domínguez y col., 2008). Las plantas mostraron unos contenidos en parte aérea en el rango de aquellos descritos para las mismas especies por Domínguez y col. (2008) en un estudio de las mismas especies en zonas colindantes, aunque el mirto no fue analizado ni tampoco las raíces de ninguna especie vegetal. Los

niveles de metales en las especies estudiadas no superaron los umbrales de fitotoxicidad descritos por algunos autores (Gardea-Torresdey y col., 2005; Álvarez y col., 2003), pero el As superó el umbral de 3 ppm (Chaney, 1989) en algún caso. Por tanto, aunque las plantas en la zona superan los intervalos de normalidad de concentración de elementos traza en planta (Kabata Pendias y Pendias, 1992), los niveles no son especialmente altos. Domínguez y col. (2008) encontraron resultados parecidos a lo largo del Corredor Verde, en los que ningún arbusto mediterráneo estudiado mostró concentraciones de contaminantes excesivamente elevadas. En dicho estudio encontraron que los ejemplares adultos que sobrevivieron al vertido tenían en algunos casos concentraciones de metales más elevadas que los juveniles revegetados tras el vertido, siendo los chopos y los sauces las especies con mayores concentraciones de elementos traza en la parte aérea. En un experimento realizado anteriormente en El Vicario con plantas de *Lupinus angustifolius*, *Heliantus annuus* y *Zea mays* cultivadas durante 2 meses (Alexandre, 2003), los resultados de Cd, Cu y Zn en parte aérea fueron superiores a los observados para plantas arbustivas mediterráneas. En un estudio realizado anteriormente en la misma parcela en que se enmarca el presente estudio, Vázquez (2004) encontró en plantas de altramuz crecidas durante 5 meses valores de Cu menores que los observados en la parte aérea y la raíz de las plantas arbustivas mediterráneas, mientras que los de As y Zn fueron similares. En otro estudio realizado en El Vicario con el objetivo de evaluar el potencial fitoextractor de *Brassica juncea* (Clemente, 2004; Clemente y col., 2005), la parte aérea de dichas plantas mostró concentraciones en parte aérea de Zn, Cu, Cd y As mucho más altas que las encontradas en las especies arbustivas plantadas para el presente estudio, aunque el primer ciclo de cultivo obtuvo mayores concentraciones que el segundo (se llevaron a cabo entre 2000 y 2001).

Con respecto a la concentración de As en las raíces de las especies arbustivas mediterráneas crecidas en la parcela de El Vicario (Tabla 34), los valores analizados fueron menores que las concentraciones que fueron ensayadas en el experimento del Capítulo 5 (Tabla 21). Por ello, el riesgo de removilización del As de las raíces vegetales será siempre inferior al estimado en dicho ensayo.

Este es el primer estudio, al menos que nosotros conozcamos, en el que se hayan analizado los metales y As presentes en las raíces de las especies replantadas a lo largo del Corredor Verde. Sorprendentemente, los valores en las raíces no son excesivamente altos, incluso son del mismo orden de magnitud de los analizados en parte aérea en muchos casos. Y esto es sorprendente porque una estrategia común descrita en el mundo vegetal de protegerse de los efectos tóxicos de los elementos traza es inmovilizarlos en la raíz (Capítulos 4 y 6; Dahmani-Muller y col., 2000; Clemens y col., 2002; Juárez Sanz y col., 2006). En concreto, plantas arbustivas mediterráneas que demostraron valores de relación $[As]_{PA}/[As]_{raiz}$ menores que 1 para metales o mucho menores que 1 para As en hidroponía y cultivo en suelo en invernadero (Ver Capítulos 4 y 6), en el experimento de campo muestran valores más elevados. Ya en estudios previos, el altramuz había demostrado relaciones $[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$ de As y Cd menores a 1 en hidroponía y campo, pero en condiciones de campo dicha relación fue 34 y 63% superior para Cd y As respectivamente (Vázquez, 2004). Esta discrepancia en estos valores pone de manifiesto las diferencias en la fisiología de la planta (en la absorción, translocación, redistribución, etc.) entre sistemas de cultivo

controlados y el cultivo en campo y advierten de la necesidad de utilizar todos ellos para obtener resultados fiables.

En el caso de la relación $[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$ de metales y As cabe destacar que los datos de campo apuntan a que los experimentos en tiestos infravaloran la translocación obtenida en campo. Así el ratio es bastante más alto en este ensayo de campo (Tabla 35) que los valores observados en el ensayo hidropónico (Tabla 14; Tabla 31). La explicación posible para este fenómeno sería la dificultad metodológica de extraer raíces en campo. En el campo la raíz extraída suele ser la principal, ya engrosada y lignificada en muchos casos. Por ello, es una raíz distinta completamente a aquellas raíces jóvenes que son más delgadas y menos lignificadas. Dichas raíces jóvenes son las que son activas en la absorción de elementos y las que tienen una mayor superficie específica. Además, en un tiesto las raíces suelen desarrollarse bajo condiciones más favorables de humedad, temperatura, etc. Por ello son necesarios ensayos de ambos tipos para poder comparar los datos obtenidos en distintas condiciones ambientales. En el caso del As, si comparamos los factores de transferencia de la hidroponía, el cultivo de tiestos en invernadero y las plantas en campo, podemos concluir que el ratio $[As]_{PA}/[As]_{raiz}$ es mayor en el caso de condiciones reales de campo. De cualquier modo, el factor de transferencia del As del medio a la parte cosechable de la planta es muy bajo en todos los casos. En el caso del hidropónico es muy baja la acumulación en parte aérea y en el caso del suelo, la concentración en parte aérea es mucho menor que la del suelo sobre el que la planta crece. Todo apunta por tanto a que las plantas en general tienden impedir la entrada de As en sus tejidos y protegen la parte aérea especialmente. En un estudio reciente, Zabłudowska y col. (2009) también observaron diferencias entre sistema de cultivo hidropónico y en campo en la acumulación de As y las estrategias de detoxificación. En este estudio, la planta que alcanzó mayor concentración de As en condiciones de campo no fue la que obtuvo las mayores concentraciones en el estudio hidropónico. En nuestros estudios, el taray destacó por su capacidad de absorber As en el estudio hidropónico pero no demostró dicha capacidad en el ensayo de campo y en el ensayo de suelo en invernadero. En el estudio de Zabłudowska y col. (2009) además identificaron el As(III) como la especie predominante en hojas de planta crecidas en hidroponía, pero en las hojas de las plantas de campo predominaba As(V), lo que podría estar indicándonos cambios en la fisiología vegetal en función del sistema de cultivo. Otro aspecto que puede condicionar las diferencias de translocación desde la raíz a la parte aérea es el volumen de suelo/sustrato explorado en cada sistema de cultivo, que puede ser muy diferente entre la hidroponía, el ensayo en tiestos y el campo. Además, hay que tener en cuenta que las plantas protegen su parte aérea de la llegada de elementos tóxicos (Clemens y col., 2002), por lo que cuanto mayor sea la disponibilidad del elemento traza, mayor será la proporción retenida en la raíz. Puesto que la hidroponía proporciona a la planta elevadas concentraciones de As disponible en comparación con lo que ocurre normalmente en suelos, cabe esperar una menor relación $[As]_{PA}/[As]_{raiz}$ en el caso de la hidroponía (Huang y col., 2006). Estas diferencias de relación $[ET]_{PA}/[ET]_{raiz}$ usando distintos sistemas de cultivo también ha sido descrita para el Hg, mostrando un patrón similar (Zornoza y col., 2010).

Conclusiones

La movilidad de los elementos traza en los suelos aparece dominada por el pH en las parcelas estudiadas, aunque el As muestra un comportamiento más complejo y su relación con el pH es compleja. En los suelos ácidos el aluminio se movilizó, pudiéndose convertir en un contaminante. La supervivencia vegetal fue baja para mirto y taray, pero la retama y el romero (en las parcelas con pH mayor a 4,5) mostraron una buena supervivencia. El establecimiento de plantas pioneras en un suelo contaminado asiste el establecimiento de una comunidad vegetal en suelos contaminados, además de mejorar las relaciones hídricas y la materia orgánica en el suelo (Gionocchio y col., 2004). En el capítulo anterior vimos como la retama mejoraba la calidad de los suelos en los que crecía, acondicionándolos para el establecimiento sostenible de una comunidad vegetal (Mench y col., 2009). Todo ello, junto a la baja transferencia de contaminantes a la parte aérea de las plantas, apoya la aplicabilidad de la fitoestabilización, utilizando retama como la especie más eficaz.

8. DISPERSIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN LOS SUELOS CERCANOS A UNA MINA DE ARSENOPIRITA EN BUSTARVIEJO (MADRID). TRANSFERENCIA A PLANTAS Y AGUAS.

Objetivos: Estudiar, bajo condiciones de campo, la movilidad y fraccionamiento del arsénico en suelos afectados por una actividad minera prolongada. Evaluación de la transferencia de As a la vegetación autóctona y búsqueda de especies con características interesantes para fitorremediación de suelos mineros.

Materiales y Métodos

Descripción del lugar de estudio y recogida de muestras (suelos, plantas y aguas)

La Mina Mónica está situada en un valle de media montaña de la Sierra de Madrid, en el término municipal de Bustarviejo (Madrid, España). El valle tiene vegetación arbórea en las partes bajas y de rivera y arbustiva en las zonas más altas y escarpadas. Los suelos fueron muestreados en una zona con una extensión de 20 ha, siguiendo los arroyos de La Mina y La Barranca entre las siguientes coordenadas UTM: 30T – X=0438606, Y=4524302; X=0437797, Y=4523518. El muestreo se realizó en los meses de Mayo y Junio de 2006. Se recolectó parte aérea de 25 especies de plantas vasculares, además del suelo superficial (0-30 cm) colindante a las plantas. Además el agua de los arroyos fue también recogido en varios puntos a lo largo del transecto. Todos los puntos fueron georreferenciados con GPS. La Figura 45 muestra la distribución de los puntos de muestreo de suelo y aguas en un mapa topográfico de la zona. Las muestras de suelo se dividieron en 3 grupos en función del grado de afección por la actividad minera: i) suelos cercanos a los escombros mineros, ii) suelos afectados por la red de drenaje, y iii) suelos no afectados.

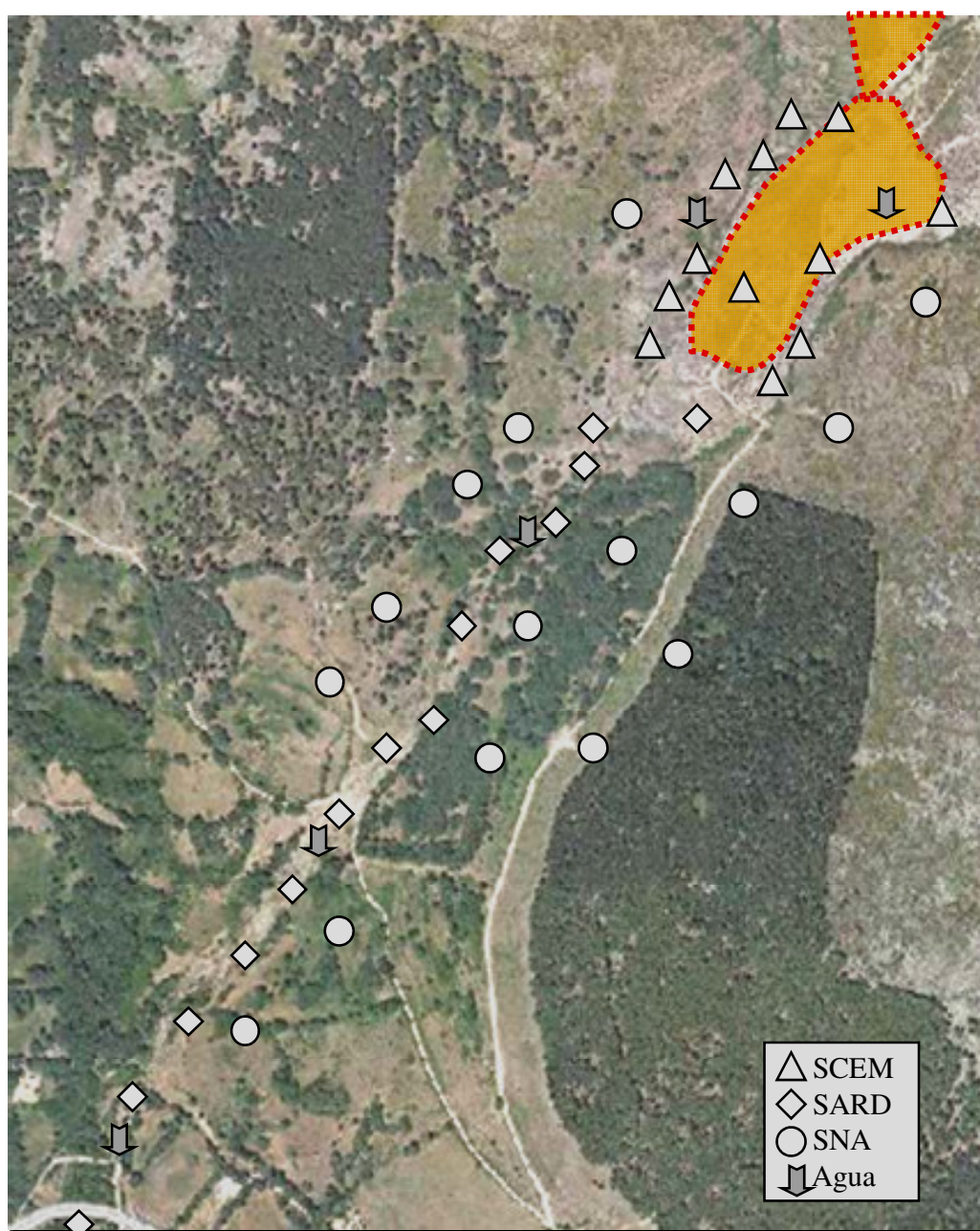


Figura 45. Puntos de muestreo de suelos (SCEM: suelos cercanos a escombros mineros; SARD: suelos afectados por la red de drenaje; y SNA: suelos no afectados) y aguas a lo largo del valle minero. En naranja se muestra la zona afectada por escombros procedentes de la actividad minera.

La zona estudiada muestra 3 tipos de vegetación: en las partes altas se desarrolla un denso piornal de *Genista cinerascens* Lange y *Cytisus oromediterraneus* Rivas Martínez et al. (Genisto-Cytisetum oromediterranei); en la parte baja, un bosque abierto de *Quercus pyrenaica* Willd. con un sotobosque herbáceo (Luzulo-Quercetum pyrenaicae); a lo largo de los arroyos, una comunidad de riera (Rubo-Salicetum atrocinereae) con *Salix atrocinerea* Brot., *Athirium filix-femina* (L.) Roth y *Frangula alnus* Miller.

Procedimientos analíticos

Suelos

Los suelos se secaron al aire en el invernadero durante 7 días, fueron tamizados a tamaño <2 mm y homogeneizados. Tanto pH como materia orgánica se midieron por los métodos oficiales del MAPA (1994), en una suspensión 1:2.5 y por el método del dicromato potásico respectivamente. La concentración total de elementos en suelo se realizó mediante la digestión de 0,5 g de suelo en 6 mL H₂O, 6 mL y 4 mL HNO₃:H₂O₂ en autoclave a 125 °C y 1,5 kPa durante 30 min. Se filtró y se enrasó con agua mili-Q a 50 mL. El elemento extraíble se determinó de este modo: a 1,5 g de suelo se le añadieron 15 mL de sulfato amónico 0,1 M, se agitó durante 4 horas, se filtró, se añadieron 0,15 mL de HNO₃ y se conservó en frigorífico.

Para el estudio del fraccionamiento de arsénico se eligieron al azar cuatro suelos de cada uno de los grupos. El fraccionamiento se realizó sometiendo las muestras de suelo a una extracción secuencial específica de As, siguiendo el procedimiento descrito en los Materiales y Métodos del Capítulo 6 (Wenzel y col., 2001).

Aguas

Las muestras de agua se recogieron en recipientes de plástico, y se añadieron 0,2 mL de ácido nítrico a cada 20 mL de muestra para su correcto almacenamiento. Las muestras se mantuvieron en el frigorífico hasta el momento del análisis. Adicionalmente, la disolución intersticial del suelo fue también muestreada según el procedimiento propuesto por Clemente y col. (2008). Para ello se utilizaron sondas de succión *Rhizo* (Eijkelkamp, Holanda) que se insertaron en el suelo a unos 15-30 cm de profundidad de forma horizontal en cinco zonas representativas: una en un suelo sin contaminar, dos cercanas a la red de drenaje y dos en suelos afectados por los escombros mineros. Las sondas se dejaron equilibrar durante 3 semanas y posteriormente se insertó un tubo de bajo vacío para extraer la disolución. Se obtuvieron al menos 2 ml de muestra en cada sonda.

Plantas

El material vegetal fue intensamente lavado primero con agua del grifo, después se sumergió en agua del grifo y posteriormente en agua destilada durante 2 minutos. Las plantas se secaron a 60 °C durante 3 días. Para la mineralización ácida se añadieron a 0,5 g de parte aérea 10 mL de agua mili-Q, 3 mL de ácido nítrico, y 2 de agua oxigenada. Se digirió a 125 °C y 1,5 kPa en autoclave durante 30 minutos, se filtró y se enrasó con agua mili-Q a 25 mL.

Análisis elemental

Los metales en los extractos de suelo y planta y en las aguas se determinaron por Espectroscopia de Absorción Atómica, el As se determinó mediante Fluorescencia Atómica (Vázquez y col., 2008a) y el P mediante colorimetría (MAPA, 1994).

Procesado de datos y análisis estadístico

Los datos fueron procesados usando SPSS® para Windows. Las diferencias estadísticas entre los grupos de suelo se determinaron usando los test no paramétricos de Kruskal-Wallis o de Wilcoxon. Se realizó una correlación lineal entre variables para los parámetros de suelo. Además, se realizó para suelos y plantas un análisis de componentes principales. Las extracciones secuenciales se compararon mediante test de Tukey. ArcGIS 9.0® se utilizó para realizar un geoprocesado de la contaminación de As en los suelos, realizando una representación espacial de la concentración de As usando la herramienta “*Inverse Distance Weighted*”, con los 12 puntos más próximos. Los factores calculados en planta fueron: FT (factor de transferencia) = $[As]_{PA}/[As]_{suelo}$; BAF (factor de bioacumulación) = $[As]_{PA}/[As]_{extraible}$.

Resultados

Distribución de As en suelos

En los suelos se determinaron materia orgánica, pH, Fe, P y As (Tabla 36), además de los metales pesados, que fueron descritos en otro trabajo (Moreno-Jiménez y col., 2009). Todos los suelos analizados mostraron un pH ácido y no se apreciaron diferencias significativas entre grupos de suelos, a pesar de que la oxidación de la pirita suele producir acidificación de los suelos (Clemente y col., 2006b). Tampoco se observaron diferencias significativas entre grupos de suelos para la materia orgánica, cuyos valores estuvieron comprendidos entre 0,7 y 13%. El contenido de Fe total en todos los suelos fue alto, probablemente debido al fondo geoquímico de la zona, aunque las concentraciones más altas se obtuvieron en los suelos afectados por los escombros mineros ($P < 0,01$), en los que los minerales de arsenopirita son abundantes. En los suelos afectados por los escombros se determinaron también niveles altos de As ($> 600 \text{ mg kg}^{-1}$), así como de en algunos afectados por las aguas de drenaje de la mina. Todo ello causó diferencias significativas en la concentración de As total y extraíble con sulfato amónico entre los grupos de suelos ($P < 0,001$). La disolución de sulfato amónico solo pudo extraer entre 0,02 y 0,68% del As total del suelo. Los suelos afectados por las aguas de drenaje mostraron mayor contenido en P total ($P < 0,05$), pero no hubo diferencias significativas entre grupos en el caso del P extraíble con sulfato amónico.

Tabla 36. pH, materia orgánica y elemento total y disponible en suelos cercanos a la mina Mónica (Bustarviejo, Madrid). Media (error estándar, EE), mediana y rango ($n=12-16$). Las diferencias significativas se evaluaron con el test de Kruskal-Wallis (K-W): ***= $P < 0,001$; **= $P < 0,01$; *= $P < 0,05$; n.s.=no significativas. n.d.=no detectable.

	Suelos cercanos a los escombros			Suelos afectados por el drenaje minero			Suelos no afectados			K-W
	Media (EE)	Mediana	Rango	Media (EE)	Mediana	Rango	Media (EE)	Mediana	Rango	
pH	4,87 (0,25)	4,17	3,89-5,99	5,27 (0,13)	5,20	4,24-6,09	5,08 (0,11)	5,16	4,01-5,90	n.s.
MO (%)	4,33 (1,00)	3,19	0,69-8,61	5,91 (0,94)	5,41	1,83-13,04	6,28 (0,70)	6,62	2,11-11,66	n.s.
Fe pseudo-total (%)	2,02 (0,01)	1,86	1,32-3,38	2,16 (0,02)	2,03	1,01-3,45	1,36 (0,01)	1,42	0,94-1,65	**
Elemento total (mg kg⁻¹)										
As	1544 (209)	1719	686-3003	638,2 (168,2)	561,4	26,3-1907	38,1 (8,2)	27,5	3,6-107,7	***
P	283,4 (64,5)	244,0	59,3-878,0	540,1 (83,0)	561,7	216,7-1166	283,6 (26,9)	281,4	108,8-592,4	*
Cd	16,35 (3,15)	13,72	1,78-34,98	8,68 (1,37)	9,75	2,44-15,29	2,91 (0,50)	2,89	n.d.-6,15	***
Cu	308,7 (56,4)	301,7	17,3-605,3	182,2 (38,9)	186,7	15,5-444,3	16,6 (2,3)	13,3	6,2-32,5	***
Mn	353,6 (47,8)	298,9	184,7-658,4	432,6 (62,2)	405,3	158,9-1002	427,8 (49,7)	517,3	76,9-647,8	n.s.
Zn	845,7 (186,2)	604,2	92,4-2244	571,1 (111,4)	566,4	75,2-1438	96,7 (14,0)	92,9	30,8-200,3	***
Elemento extraíble con (NH₄)₂SO₄ (mg kg⁻¹)										
As	2,84 (0,53)	2,33	1,17-6,55	1,71 (0,27)	1,59	0,11-3,18	0,05 (0,02)	0,01	n.d.-0,24	***
P	3,72 (1,00)	3,65	n.d.-9,60	4,07 (1,17)	5,48	n.d.-12,35	3,24 (0,76)	5,03	n.d.-11,87	n.s.
Fe	4,49 (0,99)	3,57	1,07-12,48	3,64 (0,29)	3,35	2,22-5,52	2,67 (0,21)	2,67	2,15-4,73	n.s.
Cd	2,01 (0,72)	1,32	0,06-7,23	1,36 (0,26)	1,38	0,10-2,66	0,19 (0,06)	0,11	n.d.-1,00	***
Cu	2,68 (0,59)	2,21	0,46-6,32	2,08 (0,58)	1,35	0,30-4,30	0,34 (0,04)	0,33	0,05-0,71	***
Mn	18,2 (3,9)	17,2	1,4-46,6	34,3 (7,1)	34,2	3,7-73,7	48,7 (15,8)	28,1	3,21-255,9	n.s.
Zn	51,0 (15,9)	42,8	1,24-149,4	38,6 (8,5)	36,5	4,95-84,5	1,9 (0,7)	0,8	0,1-13,1	***

Se realizó un análisis de correlación bivariada entre las variables determinadas en suelo para identificar aquellas más correlacionadas con la distribución de As en el suelo (Tabla 37). La concentración de As total y disponible se correlacionaron fuertemente ($P < 0,001$), con el coeficiente más alto ($r = 0,84$), sugiriendo que, en este caso particular, la cantidad de As débilmente retenido en suelo está íntimamente relacionada con el contenido total. Adicionalmente hubo otras variables también correlacionadas con el As disponible en suelo: el Fe total, el P total y el P disponible.

Tabla 37. Análisis bivariado de correlación (coeficiente de Pearson, r) en datos de suelos: pH, materia orgánica, As/P total (T) y extraíble por sulfato amónico (Ext), ($n=41$; $*$ = $P < 0,05$; $**$ = $P < 0,01$; $***$ = $P < 0,001$). Se muestran solo las correlaciones significativas.

	pH	MO	[Fe] _T	[As] _T	[P] _T	[As] _{Ext}
MO	0,366*					
[As]_T			0,651***			
[P]_T	0,389*	0,448**	0,608***			
[As]_{Ext}			0,719***	0,840***	0,327*	
[P]_{Ext}			-0,552***	-0,556***	-0,336*	-0,500***

Posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal para identificar los factores que afectan a la extractabilidad de As en estos suelos. Algunos parámetros fueron eliminados del modelo por su baja significación (materia orgánica y pH). La ecuación resultante fue:

$[As]_{Ext} = -0,86 + 0,001 \cdot [As]_{Tot} + 4,5 \cdot 10^{-5} \cdot [Fe]_{Tot} + 0,024 \cdot [P]_{Ext} + 0,001 \cdot [P]_{Tot}$; $F = 29,4$ ($P < 0,001$), $R^2_{adj} = 0,74$. La significación de los parámetros fue $<0,001$ para el As total y el Fe, $<0,005$ para el P disponible y $<0,05$ para el P total.

Cuando los datos de As y P se incluyeron en el análisis de componentes principales realizado por Moreno-Jiménez y col. (2009), el arsénico total en suelos se mostró asociado a otros contaminantes en el factor 1 como Cd, Zn y Cu, pero además con el Fe (todos ellos con pesos superiores a 0,77). Sin embargo el P y el Mn aparecen asociados a la materia orgánica y al pH en el factor 2, por tanto no parecen relacionados con la contaminación derivada de la actividad minera.

La Figura 46 ilustra la dispersión espacial del arsénico en los suelos utilizando un software específico de información geográfica (ArcGIS 9.0®). Las zonas con abundantes escombros mineros coinciden con los polígonos más oscuros. Se observa también una importante pluma de contaminación asociada con la escorrentía superficial que pasa por la zona de los residuos mineros, pero también existen polígonos con bajos niveles de As (polígonos claros).

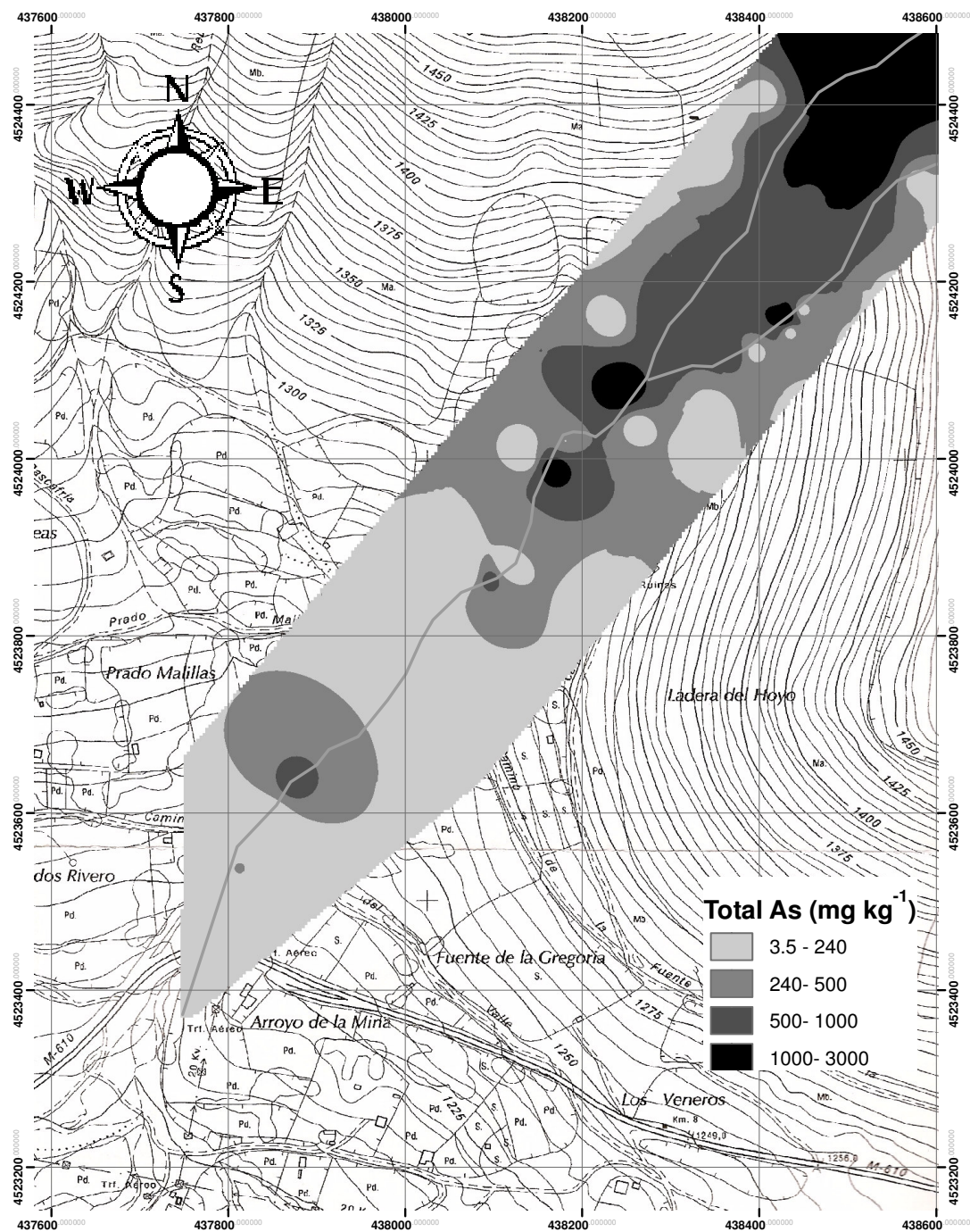


Figura 46. Dispersión del As en los suelos superficiales a lo largo del valle. Las categorías se definieron usando el programa específico ArcGIS 9.0 ® (la interpolación que se aplicó fue el peso de las distancias inversas con los 12 puntos más próximos).

Con el fin de comprender mejor la baja extractabilidad del As y a qué componentes se encuentra asociado se realizó una extracción secuencial optimizada para el As en las muestras de suelos (Tabla 38). Los porcentajes de arsénico extraíble en las dos primeras etapas fueron bajos (extraíbles con sulfato amónico y con fosfato amónico), y no se observaron diferencias significativas entre grupos de suelos. Las etapas 3 y 4 (fracciones asociadas a óxidos de Fe y Al no cristalinos y cristalinos) extrajeron la mayor parte del As en los suelos no afectados (>80%), pero también extrajeron una importante proporción en los suelos contaminados (41-55%). Finalmente, en la última etapa se obtiene la fracción residual, que constituyó un alto porcentaje en los suelos contaminados (38-55%).

Tabla 38. Porcentaje (%) de As retenido en las distintas fracciones de la extracción secuencial y concentración total de As (mg As kg⁻¹ suelo). Media \pm EE ($n=4$), diferentes letras implican diferencias significativas entre grupos de suelo ($P < 0,05$, test de Tukey). F1: no específicamente retenido; F2: específicamente retenido; F3: óxidos amorfos de Fe y Al; F4: óxidos cristalinos de Fe y Al; F5: fracción residual (Wenzel y col., 2001). Rango para el As total. Cada muestra se extrajo por duplicado.

Grupo de suelo	Fracciones de As					As Total
	F1	F2	F3	F4	F5	
SCEM	0,17 \pm 0,09 a	3,68 \pm 0,68 a	18,0 \pm 3,5 a	23,7 \pm 5,2 a	54,2 \pm 7,6 b	776-2,137
SARD	0,27 \pm 0,07 a	3,78 \pm 0,81 a	29,3 \pm 3,9 ab	28,5 \pm 3,4 a	38,7 \pm 7,7 b	209-1,229
SNA	0,25 \pm 0,15 a	6,78 \pm 2,09 a	39,8 \pm 1,4 b	43,9 \pm 2,2 b	6,7 \pm 3,2 a	26-105

No se pudo detectar el As en la disolución del suelo de suelos no afectados, pero en suelos afectados se detectaron niveles de As de 2, 117, 62 y 2901 $\mu\text{g L}^{-1}$ (este último justo debajo de una escombrera). Mientras tanto, los niveles de As en aguas fueron de 54, 115, 147, 166 y 244 $\mu\text{g L}^{-1}$. Aguas arriba de la entrada de la mina, se detectaron 28 $\mu\text{g L}^{-1}$, lo que puede ser indicativo del fondo geoquímico en aguas de la zona. El nivel descrito por la OMS como perjudicial para la salud humana en aguas de consumo es de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Steinmaus y col., 2006), mientras que la legislación española fija en 50 $\mu\text{g As L}^{-1}$ el objetivo de calidad de aguas superficiales (BOE, 2000).

Plantas

La concentración de As en la parte aérea de las plantas que vivían en la zona de estudio se muestra en la Tabla 39, además de los factores de transferencia (TF) y de bioacumulación (BAF). Se compararon las medias del contenido de As en los diferentes grupos de plantas: plantas vasculares sin semillas (helechos), herbáceas y leñosas. Se observaron diferencias significativas entre estos grupos ($P < 0,05$), siguiendo las concentraciones de P y As tendencias parecidas: herbáceas>helechos>leñosas. Los helechos mostraron concentraciones menores a 2 mg kg^{-1} en parte aérea, a pesar de los altos niveles de As en los suelos en los que crecían. Para ellos el TF fue menor de 0,01, indicando que son pobres acumuladores de As, mientras el BAF se encontró entre 1 y 2. Las herbáceas mostraron la concentración de As más alta ($1,44 \text{ mg kg}^{-1}$ de media). De todas las especies, la media más alta ($3,5 \text{ mg kg}^{-1}$) corresponde a *Glyceria fluitans*, seguida de *Diplotaxis euricoides* ($2,1 \text{ mg kg}^{-1}$). En algunas especies, el As no se pudo detectar (p. ej., *Hypericum perforatum* y *Daucus carota*). Entre las herbáceas, el mayor valor de BAF se obtuvo para *Digitalis thapsi*, y el mayor TF para *D. euricoides*. Las plantas leñosas mostraron menor concentración de As en sus tejidos, correspondiendo los valores mayores de As a *Salix atrocinerea* ($1,9 \text{ mg kg}^{-1}$), y los menores a *Genista cinerascens* ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$). Cuando fue posible se analizaron tallos y hojas por separado, obteniéndose mayores concentraciones de As en hojas que en tallos (datos no mostrados). Tanto el TF como el BAF variaron mucho a lo largo de este grupo: $<0,0011$ - $0,02$ y $0,1$ - 14 respectivamente. *Betula pendula* mostró los valores más bajos de TF y BAF, *S. atrocinerea* el más alto de TF y *Cytisus scoparius* el más alto de BAF.

Tabla 39. Concentraciones de P y As en la parte aérea de las plantas que crecían en el área cercana a la mina Mónica, media (rango), $n=2-12$. Para los grupos de plantas (plantas vasculares sin semilla, herbáceas y leñosas) de muestran media \pm EE y las diferentes letras implican diferencias significativas entre grupos evaluadas mediante el test de Tukey ($P < 0,05$). Se muestra también la media calculada para los factores de transferencia (TF) y de bioacumulación (BAF).

Especie	P ($\mu\text{g g}^{-1}$)	As ($\mu\text{g g}^{-1}$)	TF	BAF
Helechos	683 \pm 196 ab	0,89 \pm 0,27 ab	-	-
<i>Equisetum ramosissimum</i>	870 (783-957)	1,78 (1,65-1,90)	6,72 \cdot 10 ⁻³	1,45
<i>Pteridium aquilinum</i>	564 (98,8-1403)	0,26 (n.d-0,96)	1,17 \cdot 10 ⁻³	2,00
<i>Athyrium filix-femina</i>	837 (129-1940)	1,84 (1,77-1,90)	3,61 \cdot 10 ⁻³	1,01
Herbáceas perennes y anuales	870 \pm 106 b	1,44 \pm 0,32 b	-	-
<i>Centaurea nigra</i>	336 (268-398)	0,88 (0,09-1,78)	5,10 \cdot 10 ⁻³	19,4
<i>Hypericum perforatum</i>	334 (238-353)	n.d.	-	-
<i>Digitalis thapsi</i>	867 (438-1713)	1,57 (0,25-1,90)	3,19 \cdot 10 ⁻³	99,8
<i>Aira caryophylllea</i>	1038 (1017-1061)	1,81 (0,97-2,65)	4,85 \cdot 10 ⁻³	1,71
<i>Glyceria fluitans</i>	1047 (886-1225)	3,52 (1,68-7,10)	2,40 \cdot 10 ⁻³	0,87
<i>Diplotaxis eruroides</i>	1100 (643,2-1423)	2,06 (1,94-2,15)	5,40 \cdot 10 ⁻³	2,05
<i>Daucus carota</i>	1442 (1031-1852)	n.d.	-	-
<i>Silene latifolia</i>	1137 (446,7-2172)	1,47 (0,0216-1,91)	5,01 \cdot 10 ⁻³	2,20
Leñosas	475,4 \pm 47,6 a	0,58 \pm 0,10 a	-	-
<i>Cytisus scoparius</i>	431 (129-670)	0,30 (0,06-1,05)	5,44 \cdot 10 ⁻³	14,1
<i>Cytisus oromediterraneus</i>	302 (113-672)	0,60 (0,00-1,94)	6,43 \cdot 10 ⁻⁴	0,17
<i>Genista cinerascens</i>	306 (100-598)	0,20 (n.d-1,05)	3,91 \cdot 10 ⁻⁴	0,36
<i>Adenocarpus complicates</i>	837 (459-1060)	0,28 (0,16-0,36)	8,37 \cdot 10 ⁻⁴	0,23
<i>Thymus mastichina</i>	279 (198-438)	0,25 (n.d-0,75)	2,15 \cdot 10 ⁻²	7,74
<i>Santolina rosmarinifolia</i>	697 (642-752)	0,52 (0,52-0,51)	0,27 \cdot 10 ⁻³	0,19
<i>Frangula alnus</i>	590 (376-884)	0,87 (0,42-1,19)	1,57 \cdot 10 ⁻³	0,47
<i>Betula pendula</i>	582 (507-657)	0,20 (0,15-0,25)	1,79 \cdot 10 ⁻⁴	0,10
<i>Erica arborea</i>	536 (293-1095)	0,22 (n.d-0,71)	2,54 \cdot 10 ⁻⁴	0,15
<i>Salix atrocinerea</i>	601 (171-2148)	1,93 (0,52-2,86)	1,93 \cdot 10 ⁻²	4,02

La concentración de As en suelos (total y extraíble en sulfato amónico) se correlacionó con la concentración en parte aérea de las especies dominantes (Tabla 40), evaluando esta relación para cada especie por separado. Se obtuvieron correlaciones altas y significativas entre la concentración en planta y aquella extraíble con sulfato amónico en los suelos sobre los que crecía, mientras que la correlación no fue significativa para algunas especies si se tomaba el valor de As total.

Tabla 40. Coeficiente de Pearson (r) entre concentración de As en planta y suelo (extraíble con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o total) para las especies dominantes ($n=5-12$; $*=P < 0,05$; $**=P < 0,01$; $***=P < 0,001$).

	As disponible	As total
<i>S. atrocinerea</i>	0,75*	0,54
<i>C. scoparius</i>	0,73**	0,34
<i>G. cinerascens</i>	0,95***	0,79*
<i>E. arborea</i>	0,68*	0,75*
<i>P. aquilinum</i>	0,72*	0,47
<i>C. oromediterraneus</i>	0,97**	0,67
<i>F. alnus</i>	0,79*	0,70
Media de r	0,79	0,61

Discusión

Arsénico en suelos

El 30% de los suelos analizados (Tabla 36) contenía niveles de As 30-125 veces más elevados que el límite de 24 mg kg⁻¹ fijado por la Comunidad de Madrid como el valor a partir del que se hace necesaria la investigación y evaluación toxicológica (BOCM, 2007). Mientras el As excedió este límite hasta en 125 veces, el resto de metales solo lo hizo en 10, 8 y 2 veces respectivamente para Cd, Cu y Zn (Moreno-Jiménez y col., 2009). De acuerdo con la simulación espacial realizada (Figura 46), un área de más de 20000 m² podría tener concentraciones de As superiores a 1000 mg kg⁻¹ en la superficie estudiada. La concentración total de As en el suelo es un pobre indicador de la movilidad, disponibilidad y el riesgo ambiental asociado (Sheppard, 1992; Adriano, 2001), siendo más útil para evaluar la transferencia del As del suelo a otros compartimentos del ecosistema la concentración de elemento extraída mediante disoluciones salinas o las extracciones secuenciales (Madejón y col., 2006c; Menzies y col., 2007; Clemente y col., 2008; Vázquez y col., 2008a). Los niveles de As fácilmente extraíbles en suelo y la concentración de As en plantas (Tablas 36,39) son muy bajos en comparación con los niveles totales en suelos. Las disoluciones diluidas de sales neutras se proponen como extractantes adecuados para valorar el impacto de los elementos traza sobre las plantas y la actividad biológica del suelo (Kabata-Pendias, 2004), y la solución de sulfato amónico proporciona buenos resultados en nuestro caso (Capítulo 3). Este método ha sido validado también para metales bajo condiciones de campo y numerosas especies (Moreno-

Jiménez y col., 2009). En el presente estudio, no se observó una influencia clara del pH o la materia orgánica en la disponibilidad de As. Sí se observó una fuerte influencia del As total sobre el disponible, pero además le influyeron otros factores como el P o el Fe. En estos mismos suelos, fue también la concentración total la que controló la disponibilidad de metales en el suelo (Moreno-Jiménez y col., 2009). En suelos bien aireados y con el rango de pH que tienen los suelos cercanos a la mina, la especie mayoritaria de As en la solución del suelo será H_2AsO_4^- (Sadiq, 1997). La interacción fosfato-arseniato en suelos es bien conocida, ya que ambos compiten por los mismos lugares de retención en el complejo de cambio del suelo (Peryea y Kammereck, 1997; Cao y col., 2003). La influencia del P fue particularmente interesante, pero a pesar de su alta significación dicha influencia no fue tan elevada como la del As o el Fe totales. Hubo una correlación negativa entre el P y el As extraíbles con sulfato amónico, pero el parámetro correspondiente en la regresión lineal al P disponible es positivo. Esto significaría que el P puede movilizar As de los suelos (Mihaljevic y col., 2009), pero también que en nuestro caso los suelos con un elevado As extraíble tenían bajos contenidos de P débilmente retenido. En un estudio sobre los factores que afectan al coeficiente de distribución (K_d) del arsénico en suelos, de Brouwere y col. (2004) demostraron que el arseniato y el fosfato compiten por los lugares de retención en suelos, aunque dependiendo del tipo de suelo se puede modificar la alteración que el fosfato produce en la K_d del As. La proporción del arsénico extraíble en suelos con respecto al total fue siempre $<0.7\%$. Esto concuerda con lo observado en otros estudios que usaron suelos contaminados por As (Anawar y col., 2008; Vázquez y col., 2008a; King y col., 2008). Contrasta, sin embargo, con algunos experimentos en los que se añade As al suelo en forma soluble o como sal (Gulz y col., 2005; Carpena y col., 2008), donde el As extraído por soluciones de nitrato amónico y sulfato amónico fueron del orden de 1-3% y 8-20%, sabiendo que el sulfato amónico extrae el doble de As que el nitrato amónico (Capítulo 3). Aunque muchos estudios utilizan la aplicación controlada de As al suelo (Fitz y Wenzel, 2002), los suelos artificialmente contaminados no son representativos de la geoquímica del As en suelos mineros contaminados (Ko y col., 2008), ya que la extractabilidad de arsénico es excesiva comparado con lo que ocurre en condiciones reales. Las plantas en el caso de adición artificial de arsénico muestran también tasas de absorción de As más elevadas. La baja movilidad del As en los suelos estudiados es especialmente evidente si se compara con los datos para otros metales en los mismos suelos y los porcentajes de As extraídos por este método fueron 20 veces menores que los de Cd (Moreno-Jiménez y col., 2009). La mejor correlación del As extraíble con sulfato amónico con la concentración del mismo en planta en comparación con la correlación utilizando el As total indica que la fracción fitidisponible se estima mejor mediante la extracción de la fracción débilmente retenida. Si tomamos estos datos conjuntamente con otros obtenidos bajo condiciones controladas (Vázquez y col., 2008a) y bajo condiciones de campo (Moreno-Jiménez y col., 2009), se corrobora que la extracción con sulfato amónico es un buen indicador de la fracción disponible de elementos traza en suelos. Si tenemos en cuenta el paso 2 de la extracción secuencial, ya que la fracción extraíble con fosfato amónico también ha sido usada como indicadora de la fracción disponible en suelos (Huang y col., 2006), se extrajo solamente un 7% del As total. Sabido es que la movilidad de arsénico en suelos es dependiente de su retención en minerales de Fe, Al y

Mn, en arcillas, carbonatos, fosfatos y sulfatos (Aguilar y col., 2007a; Gulz y col., 2005). La extracción secuencial muestra que en estos suelos existe un papel predominante de los (oxihidr)óxidos de Fe y Al controlando la movilidad de As (Tabla 38). Las fracciones 3 y 4 de la extracción secuencial están asociadas fundamentalmente a los óxidos amorfos y cristalinos de hierro y aluminio (Wenzel y col., 2001), y hasta un 60-80% del As estuvo retenido en estas fracciones. Esto está en clara consonancia con datos observados por otros autores previamente (Wenzel y col., 2001; Fitz y Wenzel, 2002; Kumpiene y col., 2007; Clemente y col., 2008), y la retención de As en óxidos de Fe es un fenómeno común en suelos piríticos (Strawn y col., 2002). En la fracción residual se obtuvo mayor proporción de As en el caso de los suelos contaminados, probablemente debido a la presencia de arsenopirita y matildita (Jiménez y col., 2004). El arsénico aparece asociado a Fe en la piritita y en los óxidos, lo que podría explicar la alta correlación As-Fe. El arsénico retenido en estas fracciones no es susceptible de una rápida movilización a no ser que las condiciones ambientales cambien dramáticamente. En suelos mineros fuertemente contaminados el arsénico estará retenido en los sulfuros, la fracción menos soluble (F5). Así, entre el 70-90% del As del suelo podría estar de forma inerte en los suelos afectados por actividades mineras (Conesa y col., 2008). De acuerdo con los hallazgos de Rodríguez y col. (2003) existiría un riesgo potencial asociado a la ingestión de partículas de suelo, quienes demostraron que la fracción de As unido a óxidos de Fe y Mn puede ser disuelta en el estómago, por lo que parte de estas fracciones de As inmóviles en suelos podrían ser biodisponibles para animales y humanos por esta vía de exposición. Con respecto a humanos, la agencia competente en materia de contaminación de suelos en el Reino Unido estima que el 71% de la exposición a As en zonas residenciales es debida a la ingestión de suelo y partículas (DEFRA, 2002). Las partículas de suelo se pueden digerir voluntaria o involuntariamente, pero hay también otras posibles vías de exposición en humanos, como la inhalación de partículas y la absorción dérmica (Abrahams, 2002). La ingestión de suelo es una vía principal de entrada de elementos traza al ganado en suelos contaminados (Thornton y Abrahams, 1983). Vacas y caballos están pastando frecuentemente en la zona, y pueden estar directamente expuestos a la ingestión de partículas de suelo. Existe en la zona una importante cantidad de suelos con escombros sin revegetar, lo que incrementa la dispersión de las partículas cargadas de As y el riesgo asociado a la movilidad de dichas partículas.

Transferencia del arsénico a plantas y aguas

La valoración del riesgo se completó con datos de plantas y aguas, como receptores de la contaminación del suelo. Todos los datos en nuestro estudio avalan la baja movilidad del As en suelos ácidos. La mayor parte de las plantas acumulan el As en las raíces y no son capaces de translocarlo en tasas elevadas (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002), con la excepción de las hiperacumuladoras (Zhang y col., 2002). A pesar de que la concentración total de As en suelo es alta, las concentraciones en planta estuvieron por debajo de los valores de 3-10 mg kg⁻¹ de As en tejidos aéreos descritos por Chaney (1989) como potencialmente tóxicos para las plantas, aunque las concentraciones de As en planta excedieron los

niveles de 1-1,7 mg As kg⁻¹ propuestos para plantas que crecen en suelos no contaminados (Kabata-Pendias y Pendias, 1992). No se observaron síntomas de fitotoxicidad en las plantas, ni siquiera en *G. fluitans* y *S. atrocinerea*, que mostraron concentraciones de hasta 7 y 3 mg kg⁻¹ respectivamente. Los valores de TF se encontraron entre 0 y 0,037, en el rango descrito como normal para As (Kloke y col., 1984; Warren y col., 2003). Varios estudios han demostrado la baja transferencia del As a la parte aérea de las plantas (Bunzl y col., 2001; Jung y col., 2002; Anawar y col., 2006; Domínguez y col., 2008), la cual disminuye al aumentar la concentración de As en el suelo (Huang y col., 2006). Warren y col. (2003) encontraron diferencias en la transferencia dependientes de la fuente de contaminación. Teniendo en cuenta las singularidades en nuestro estudio, contaminación de origen minero y altas concentraciones de As, cabía esperar una baja movilidad del As y una baja transferencia. Si comparamos con los FT para los metales (Moreno-Jiménez y col., 2009), los órdenes de magnitud son entre 1 y 3 veces menores para el As, siguiendo la misma tendencia que los comentarios realizados en el anterior apartado de la discusión sobre el porcentaje de elemento extraíble con sulfato amónico. La baja transferencia de As a la planta puede estar limitada no solamente por la baja movilidad en suelos, si no que también puede afectar la baja capacidad de absorción a través de la membrana plasmática en comparación con otros metales como el Hg o el Cd (Esteban y col., 2003-2008; Esteban y col., datos no publicados), la interacción fosfato-arseniato (Esteban y col., 2003) o la baja translocación a parte aérea (Capítulo 4, 6 y 7). El coeficiente BAF (que tiene en cuenta el As extraído por sulfato amónico) destaca las diferencias en la capacidad de absorber el As disponible por cada especie vegetal, reduciendo los efectos del suelo (Huang y col., 2006). *Pteridium aquilinum*, *Digitalis thapsi* y *Cytisus scoparius* son las plantas que mostraron mayor BAF dentro de los helechos, herbáceas y leñosas respectivamente. Los riesgos para el ecosistema más destacables derivados de la absorción de arsénico por las plantas son i) entrada a la cadena trófica, ii) pérdida de vegetación inducida por fitotoxicidad y iii) bombeo hacia los horizontes superficiales del contaminante (Kabata-Pendias, 2004). Por ello, tanto arsénico como metales deben ser monitorizados a lo largo del tiempo para detectar cambios en el riesgo ambiental. Milton y Johnson (1999) describieron que niveles bajos de As en planta estaban asociados con baja transferencia del metaloide a la cadena trófica. Existen también claras evidencias de fitoestabilización sostenible de As en algunos hábitats naturales (Madejón y Lepp, 2007). Las plantas anuales (p. ej., *G. fluitans* y *D. euricoides*) y las hojas de plantas leñosas mostraron mayor concentración de As que otras plantas o que otros tejidos respectivamente. Ambas son componentes mayoritarios de la hojarasca y la cubierta orgánica en descomposición, lo que puede jugar un cierto papel en la removilización de elementos traza (Mertens y col., 2004). A pesar de ello, su influencia en la biogeoquímica del As en suelos parece ser baja en este caso particular, debido a las bajas concentraciones de As en tejidos aéreos en comparación con los niveles en suelos. De acuerdo con anteriores experimentos (French y col., 2006; Madejón y Lepp, 2007), las plantas leñosas presentaron los valores más bajos de As en parte aérea, lo que las avala como candidatas para fitoestabilización de suelos. Las plantas de *Salix atrocinerea* y *Cytisus scoparius* mostraron resistencia a los niveles altos de As que se encontraron en las zonas más cercanas a la mina y mostraron un alto factor de acumulación del elemento disponible. Además tienen otras

características interesantes: la primera era abundante en las zonas riparias y tiene una rápida producción de biomasa, la segunda es una leguminosa abundante en los suelos más secos.

Los arroyos mostraron concentraciones elevadas de As, incluso excediendo el límite legal para aguas potables (BOE, 2000; Steinmaus y col., 2006). Existe una abundante bibliografía detallando niveles altos de As en aguas impactadas por el alto fondo geoquímico de un emplazamiento (Smedley y Kinniburgh, 2002), siendo el arseniato la principal especie en disolución (Williams, 2001). Se considera necesario realizar estudios hidrogeológicos más completos en la zona que tengan en cuenta las descargas superficiales y subterráneas antes de pronunciarnos acerca del riesgo de la presencia de As en estas aguas. Por otro lado, el muestreo de la disolución del suelo proporciona una imagen real e instantánea de la movilidad de los elementos traza (Clemente y col., 2008; Beesley y col., 2010). Se detectaron niveles de hasta 3 mg As L⁻¹ (40 μM) en la disolución del suelo en una zona concreta bajo la influencia de los escombros y la red de drenaje, pero en los otros puntos de muestreo la concentración de As fue siempre <1,6 μM, confirmando la baja movilidad del As a pesar de las altas concentraciones en el suelo. Este hecho corrobora lo observado por Fitz y Wenzel (2002) y Clemente y col. (2008), que describieron concentraciones inferiores a 2,3 y 1,6 μM As en la disolución de suelos contaminados de Europa bajo condiciones de campo (Austria y Reino Unido respectivamente).

Propuestas para la gestión del suelo en el emplazamiento.

En el lugar estudiado el As afecta fundamentalmente a la calidad de las aguas, mientras Cd y Zn estaban menos retenidos en el suelo y su transferencia a planta fue mayor (Moreno-Jiménez y col., 2009). La dispersión de los residuos mineros es la causa principal de la presencia de elementos traza en suelos. A raíz de ello, las plantas y las aguas superficiales están también afectadas. Las técnicas comúnmente usadas para recuperación de suelos como depósito en vertedero o lavado de contaminantes impactan fuertemente sobre el equilibrio ecológico. En esta zona, en la que conservar el estado ecológico es un objetivo prioritario, deberían ser usadas otras alternativas con menor impacto para disminuir el riesgo asociado a la presencia de contaminantes en el suelo. Las escombreras de minas son difíciles de fitorremediar: sus propiedades son adversas para el establecimiento vegetal y los elementos tóxicos pueden ser movilizados hacia la zona radicular (Ernst, 2005). Tratar suelos contaminados por varios elementos traza es una tarea compleja (Kumpiene y col., 2008), y hay diversos factores edafológicos y ecológicos a tener en cuenta. Los residuos mineros deben ser enmendados para mejorar su fertilidad y estabilidad, pero también para inmovilizar elementos tóxicos. Una enmienda que podría satisfacer dichas necesidades serían los materiales compostados (Mench y col., 2003; Gadepalle y col., 2007; Tandy y col., 2009). Estas enmiendas son capaces de reducir la disponibilidad de metales en el suelo (Gadepalle y col., 2007), que también están presentes en el área de estudio (Moreno-Jiménez y col., 2009). Sin embargo, la bibliografía muestra algunos resultados contradictorios para el As: algunos autores describen inmovilización de As (Gadepalle y col., 2007), pero otros describen un incremento de la movilidad del As debido a la aplicación

de compost (Mench y col., 2003; Kumpiene y col., 2008; Hartley y col., 2009a-b). Por tanto el compost debe ser añadido con cuidado a suelos contaminados por As porque hay evidencias científicas de la movilización del As, por lo que sería necesaria una cuidadosa monitorización para garantizar el éxito de la técnica, siendo más recomendado el uso de materia orgánica altamente humificada si se pretende inmovilizar el As (De la Fuente y col., 2009). Lo que está bien establecido es que el compost es capaz de mejorar la fertilidad de los suelo y facilitar el establecimiento vegetal (Bernal y col., 2006). Para reducir la disponibilidad de As existen otras alternativas como añadir enmiendas con hierro (Warren y col., 2003; Hartley y col., 2004), pero éstas pueden inducir liberación de los metales retenidos en el suelo. Una combinación de compost (5%) y virutas de hierro (1%) fueron usadas como solución de compromiso para tratar residuos mineros de una mina de oro y minimizar a la vez la movilidad del As y metales (Mench y col., 2003). Como hemos visto anteriormente (Capítulo 6), en algunos casos un encalado puede conseguir una inmovilización del arsénico, ya sea mediante la retención como sales de calcio y sulfatos o por coprecipitación con los óxidos neofomados (Domenech y col., 2002; Sadiq, 1997). El encalado es también una medida eficaz en la inmovilización de metales pesados (Basta y McGowen, 2004), por lo que podría ser también una alternativa a tener en cuenta el encalado de los escombros mineros. Una solución barata y útil para remediar suelos degradados es la revegetación (French y col., 2006; Robinson y col., 2006) y ha sido usada satisfactoriamente en zonas mediterráneas (Domínguez y col., 2008). El establecimiento vegetal en el experimento de Mench y col. (2003) también mejoró después de añadir la mezcla compost+hierro. El establecimiento de una cubierta de vegetación previene la erosión, la ingesta de suelo, la lixiviación y la movilidad de los elementos traza (Robinson y col., 2006; Vemerali y col., 2009). Actualmente muchos autores están poniendo en duda la aplicabilidad de la fitoextracción porque existen aún varias cuestiones sin resolver, pero la fitoestabilización de elementos traza natural o antropogénica puede ser una técnica competitiva en emplazamientos similares al estudiado en Bustarviejo (Ernst, 2005; Robinson y col., 2006; Madejón y Lepp, 2007). En los suelos estudiados con baja cobertura vegetal, especies como *C. scoparius* o *S. atrocinerea* son buenos candidatos para revegetar, dependiendo de la humedad del suelo. La presencia de plantas perennes jugará un papel importante tanto ecológico como paisajístico (Vemerali y col., 2009).

Los principales riesgos potenciales asociados a los suelos en el lugar estudiado son: la elevada cantidad de elementos traza almacenados en los residuos mineros, el arsénico en aguas y el cadmio en plantas. Estos tres riesgos hacen recomendables actuaciones de recuperación, mediante adición de enmiendas y fitoestabilización. En el contexto discutido anteriormente, el área debe ser monitorizada para detectar cambios en el riesgo a largo plazo, debido a la presencia de los elementos traza. Sería deseable la realización de evaluaciones ecotoxicológicas que permitan establecer el riesgo real y la transferencia a la cadena trófica.

Consideraciones finales

9. CONSIDERACIONES FINALES.

1) Se han establecido unas metodologías válidas de trabajo para estudiar la concentración y el comportamiento del As en el sistema suelo-planta. De esta forma, la determinación del elemento total en suelos y plantas mediante una extracción en autoclave en medio ácido y oxidante mostró unos coeficientes de recuperación aceptables y con una reproducibilidad elevada. Por otra parte, el método de evaluación del elemento disponible para las plantas mediante una extracción con sulfato amónico ha obtenido correlaciones significativas con la concentración en planta y ha funcionado tanto para ensayos en condiciones controladas como en campo, utilizando distintas especies vegetales.

2) La propuesta de una tecnología de fitorremediación adecuada a un suelo contaminado con As requiere del estudio previo a varios niveles de los factores implicados, desde cultivos en hidroponía hasta ensayos de campo bajo condiciones ambientales. Se comparó el comportamiento de especies arbustivas mediterráneas utilizadas en la restauración ecológica del Corredor Verde del Guadiamar mediante distintos sistemas de cultivo, que aportaron una información complementaria:

- i) La hidroponía es un sistema óptimo para comparar absorción y resistencia de las distintas especies vegetales, a pesar de ser el más alejado de las condiciones reales en suelo. Permite controlar y aislar el factor dosis de As aplicada y observar los efectos en distintas plantas. En nuestro estudio nos permitió establecer la retama y el taray como las especies más resistentes y el taray como la que más As acumuló.
- ii) El sistema en tiestos con suelo bajo condiciones controladas permitió observar los efectos positivos del cultivo vegetal sobre la calidad del suelo, más difíciles de evaluar en campo. Se comprobó el efecto positivo del cultivo de plantas (principalmente plantas de mirto y retama) sobre la salud del suelo en términos de aumento de C, N y actividad biológica. A pesar de que el taray había destacado en la hidroponía, en este estudio no destacó por sus buenos resultados.
- iii) Por último, el cultivo en campo es la prueba final de los resultados obtenidos anteriormente. De este modo, a pesar de que el mirto fue una especie prometedora en anteriores escalas de trabajo, en campo mostró problemas de adaptación a los suelos en los que tenía que vencer la competencia de otras especies. El romero y la retama presentaron una alta supervivencia, aunque la transferencia del As desde el suelo a la planta fue baja.

El trabajo a distintas escalas combinando los resultados en cada escala con el objetivo final de la fitorremediación de suelos contaminados por As permite afirmar que la retama es una especie muy interesante para la fitoestabilización de suelos contaminados con As.

3) Se realizó un estudio de campo en Bustarviejo (Madrid) en el que se realizó un muestreo de la flora del emplazamiento y de los suelos, analizándose el As y disponible en suelo y la transferencia a la planta. Se recogieron las partes aéreas de 25 especies vegetales, entre helechos, herbáceas y plantas leñosas. Todas

las especies presentaron un bajo factor de transferencia. Las plantas de *Salix atrocinerea* y *Cytisus scoparius* eran resistentes a niveles altos de As y mostraron un mayor factor de acumulación del elemento disponible. Además tienen otras características interesantes, la primera era abundante en las zonas riparias y tiene una rápida producción de biomasa y la segunda es una leguminosa abundante en los suelos más secos. Estos factores las hacen interesantes para fitorremediación, aunque deben hacerse más ensayos aplicando el modelo seguido con las especies utilizadas en Aznalcóllar.

4) En líneas generales el As acumulado en planta tiende a almacenarse en la raíz, impidiendo concentraciones elevadas de As en parte aérea. Ello provoca que en campo las concentraciones determinadas estén lejos de valores tóxicos, a pesar de los altos niveles de As en suelos. En hidroponía, los valores tampoco fueron elevados. En general, la mayoría de las especies mediterráneas estudiadas presentaron valores bajos de As en parte aérea. La presencia de altos niveles de As en el medio de cultivo provocó síntomas de fitotoxicidad: disminución del crecimiento, estrés oxidativo, disminución del contenido en clorofilas e inducción de mecanismos de detoxificación (aumento de tioles).

5) El arsénico en suelos mediterráneos contaminados por arsenopirita y bajo condiciones aireadas presenta una baja movilidad y disponibilidad para las plantas. De este modo, el porcentaje de As extraíble respecto al total supuso menos del 0,30% en suelos de Aznalcóllar y del 0,70% en Bustarviejo. El As asociado a óxidos en los suelos mineros rondó el 40-90% respecto al total, la adsorción sobre (oxihidr)óxidos puede ser una opción efectiva en la inmovilización del metaloide. En suelos con altos niveles de As, la fracción asociada a sulfuros llegó hasta el 55% del total. Ambas fracciones representan el As poco móvil/movilizable en suelos. Todo lo expuesto complica la fitoextracción de As en suelos afectados por residuos de minería pirítica y deja como alternativa más realista la fitoestabilización de estos suelos.

6) La presencia de tejidos cargados de As en el suelo no supone un riesgo adicional de removilización del As edáfico: no se observaron incrementos notables de As disponible causados por la liberación de As soluble desde las raíces de arbustos mediterráneos en descomposición. Esto avala las actuaciones de fitoestabilización.

7) La dinámica del fosfato en el sistema suelo-planta está íntimamente relacionada con la del arseniato. En primer lugar, el fósforo disponible en el suelo movilizó el As en los suelos de Bustarviejo. En el ensayo de mineralización de raíces, el P también fue un factor que aumentó la fracción de As extraíble. Una vez en disolución, tanto arseniato como fosfato entran en la planta a través del mismo transportador en la raíz. Ello causa que una mayor dosis de As en la solución nutritiva en el ensayo de hidroponía provocara un descenso de la concentración de P en las plantas arbustivas mediterráneas.

8) Las perspectivas para aplicar las especies estudiadas en fitoestabilización fueron halagüeñas, por ejemplo *R. sphaerocarpa*, *R. officinalis*, *S. atrocinerea* o *C. scoparius*. El As no alcanza la parte aérea, está poco disponible en suelo y las plantas son capaces de resistir concentraciones de As en suelo elevadas (100-1000 ppm). Por tanto la fitoestabilización de As en suelos mineros es una opción realista. Con esta perspectiva y los resultados obtenidos, la búsqueda de diversidad vegetal mediante el uso de comunidades multi-especie para la revegetación de dichas zonas podría ser un valor adicional a tener en cuenta para obtener un ecosistema sostenible a largo plazo que garantice la fitoestabilización duradera. En estos terrenos suele haber además metales como Zn o Cd, que son los que realmente aparecen como más disponibles. Estos serán los que haya que tener en cuenta para impedir la transferencia de los contaminantes a través de los distintos compartimentos del ecosistema. La movilidad y transferencia de Zn y Cd deben ser tenidas en cuenta durante las actuaciones de fitoestabilización. Durante dicha fitoestabilización son deseables medidas de seguimiento de la presencia de elementos traza en suelos y plantas para asegurar una exitosa gestión de la técnica empleada.

Conclusiones - Conclusions

10. CONCLUSIONES.

1) Se han establecido metodologías de trabajo válidas para extraer y cuantificar el elemento total en suelos y plantas, y el fitodisponible en suelos.

2) *Retama sphaerocarpa* y *Tamarix gallica* mostraron la mayor resistencia al arsénico bajo condiciones de hidroponía, siendo *T. gallica* la que más As acumuló. En el ensayo en suelo bajo condiciones controladas, el cultivo de plantas produjo un claro efecto positivo sobre la calidad del suelo, incrementando C, N y actividad enzimática en los suelos. Las especies con efectos más positivos fueron *R. sphaerocarpa* y *Myrtus communis*. En campo, *R. sphaerocarpa* mostró la mayor supervivencia. El trabajo combinado a distintas escalas permitió seleccionar *Retama sphaerocarpa* como la especie más interesante para la fitoestabilización de suelos contaminados por As de entre todas las especies utilizadas en el Corredor Verde del Guadiamar.

3) Entre todas las especies vegetales estudiadas en el emplazamiento de Bustarviejo, *Salix atrocinerea* y *Cytisus scoparius* fueron seleccionadas como las más interesantes para estudios de fitorremediación de suelos contaminados con As.

4) El arsénico presenta baja movilidad y disponibilidad en suelos contaminados por residuos de arsenopirita bajo condiciones de buena aireación, donde parece mayoritariamente asociado a las fracciones insolubles. El riesgo de redistribución hacia las fracciones más móviles del As acumulado en la raíz durante su mineralización es bajo.

La baja disponibilidad del As, la identificación de especies con cierta resistencia, el carácter excluyente de dichas plantas, la mejora que su cultivo provoca en la calidad del suelo y el bajo riesgo de redistribución del As desde las raíces avalan la fitoestabilización de suelos mineros mediterráneos contaminados con As.

10. CONCLUSIONS.

1) A valid methodology was developed to study total element in soils and plants, as well as phytoavailable element in soils.

2) *Retama sphaerocarpa* and *Tamarix gallica* were the most resistant species to As under hydroponics, and *T. gallica* accumulated the largest amounts of As. In a soil study under controlled conditions, plant establishment induced a positive effect on soil quality, improving C, N and enzymatic activity in soils. The best effects were obtained for *R. sphaerocarpa* y *Myrtus communis*. Under field conditions, *R. sphaerocarpa* showed the highest survival. Working with several scales of study allowed us to select *Retama sphaerocarpa* plants the best candidates for As phytostabilisation of mine soils between all the plant species used for revegetation of the Green Corridor of the Guadamar river.

3) *Salix atrocinerea* and *Cytisus scoparius* were selected as the most interesting species for further studies of mine soils contaminated by As among all the studied in Bustarviejo.

4) Fraction of mobile/available As was always small in oxidizing soils affected by arsenopyritic mining, arsenic appears bound in insoluble fractions. The risk of redistribution of As from roots to more mobile/available fractions in soil is low during root mineralisation.

The low availability of As, the identification of As-resistant species with an excluder behavior, the improvements derived from plant culture in As-polluted soils and the low risk of re-distribution of As from roots to available fractions, support phytostabilisation in As-mine soils under Mediterranean conditions.

Referencias

REFERENCIAS.

- Abbas, M.H.H., Meharg, A.A., 2008. Arsenate, arsenite and dimethylarsinic acid (DMA) uptake and tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Plant & Soil* 304: 277–289.
- Abrahams, P.W., 2002. Soils: their implications to human health. *Science of the Total Environment* 291: 1–32.
- Adriano D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments. Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, New York.
- Adriano, D.C., Wenzel, W.W., Vangronsveld, J., Bolan, N.S., 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122: 121–142.
- Aguilar, J., Dorronsoro, C., Fernández, E., Fernández, J., García, I., Martín, F., Simón, M., 2004a. Soil pollution by a pyrite mine spill in Spain: evolution in time. *Environmental Pollution* 132: 395–401.
- Aguilar, J., Bouza, P., Dorronsoro, C., Fernández, E., Fernández, J., García, I., Martín, F., Simón, M., 2004b. Application of remediation techniques for immobilization of metals in soils contaminated by a pyrite tailing spill in Spain. *Soil Use & Management* 20: 451–453.
- Aguilar, J., Dorronsoro, C., Fernández, E., Fernández, J., García, I., Martín, F., Sierra, M., Simón, M., 2007a. Arsenic contamination in soils affected by a pyrite-mine spill (Aznalcóllar, SW Spain). *Water, Air, & Soil Pollution* 180: 271–281.
- Aguilar, J., Dorronsoro, C., Fernández, E., Fernández, J., García, I., Martín, F., Sierra, M., Simón, M., 2007b. Remediation of As-contaminated soils in the Guadiamar river basin (SW, Spain). *Water, Air, & Soil Pollution* 180: 109–118.
- Ahmed, F. R. S., Killham, K., Alexander, I., 2006. Influences of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and nutrition of lentil irrigated with arsenic contaminated water. *Plant & Soil* 283: 33–41.
- Alexandre, G., 2003. Descontaminación metálica de suelos de la cuenca del río Guadiamar mediante fitoextracción. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezcua, I., Albizu, I., Garbisu, C., 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Reviews in Environmental Science & Biotechnology* 3: 71–90.
- Allen, H.E., 2001. Terrestrial ecosystem: an overview. En: Allen, H.E. Ed. *Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Availability to Invertebrates, Microbes, and Plants*. SETAC Press, pp. 1–6, Pensacola, Florida.
- Alloway, B.J., 1995. *Heavy Metals in Soils*. Blackie, Glasgow.
- Álvarez, E., Fernández-Marcos, M. L., Vaamonde, C., Fernández-Sanjurjo, M. J., 2003. Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. *Science of the Total Environment* 313: 185–197.
- Álvarez-Ayuso, E., García-Sánchez, A., Querol, X., Moyano, A., 2008. Trace element mobility in soils seven years after the Aznalcóllar mine spill. *Chemosphere* 73: 1240–1246.

- Anawar, H.M., Garcia-Sanchez, A., Murciego, A., Buyolo, T., 2006. Exposure and bioavailability of arsenic in contaminated soils from the La Parrilla mine, Spain. *Environmental Geology* 50: 170-179.
- Anawar, H.M., Garcia-Sanchez, A., Regina, I.S., 2008. Evaluation of various chemical extraction methods to estimate. Plant-available arsenic in mine soils. *Chemosphere* 70: 1459–1467.
- Antosiewicz, D.M., Escudé-Duran, C., Wierzbowska, E., Skłodowska, A., Indigenous plant species with the potential for the phytoremediation of arsenic and metals contaminated soil. *Water, Air, & Soil Pollution* 193: 197-210.
- Arias, M., Pérez-Novo, C., Osorio, F., López E., Soto B., 2005. Adsorption and desorption of copper and zinc in the surface layer of acid soils. *Journal of Colloidal and Interface Science* 288: 21-29.
- Atker, K., Naidu, R., 2006. Arsenic speciation in the environment. En: Naidu, R., y col. Eds. *Managing Arsenic in the Environment. From Soils to Human Health*. CSIRO Pub., Collingwood, Australia, pp. 61-74.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68: 1-24.
- Azizur Rahman, M., Hasegawa, H., Kadohashi, K., Maki, T., Ueda, K., 2009, Hydroxyaminodisuccinic acid (HIDS): A novel biodegradable chelating ligand for the increase of iron bioavailability and arsenic phytoextraction. *Chemosphere* 77: 207-213.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 25: 369-386.
- Bañuelos, G.S., 2006. Phyto-products may be essential for sustainability and implementation of phytoremediation. *Environmental Pollution* 144: 19-23.
- Barán, E.J., 1995. *Química Bioinorgánica*. McGraw-Hill, Madrid.
- Basta, N.T., McGowen, S.L., 2004. Evaluation of chemical immobilization treatments for reducing heavy metal transport in a smelter-contaminated soil. *Environmental Pollution* 127: 73-82.
- Beesley, L., Dickinson, N., 2010. Carbon and trace element mobility in an urban soil amended with green waste compost. *Journal of Soils & Sediments* 10: 215-222.
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Clemente, R., Lepp, N., Dickinson, N., 2010. Mobility of arsenic, cadmium and zinc in a multi-element contaminated soil profile assessed by in-situ soil pore water sampling, column leaching and sequential extraction. *Environmental Pollution* 158: 155-160.
- Bentham, H., Harris, J.A., Birch, P., Short, K.C., 1992. Habitat classification and soil restoration assessment using analysis of soil microbiological and physicochemical characteristics. *Journal of Applied Ecology* 29: 711-718.
- Bernal, M.P., Clemente, R., Walker, D.J., 2009. Interaction of heavy metals with soil organic matter in relation to phytoremediation. En: Navarro-Aviño, J.P., Ed., *Phytoremediation: The Green Salvation of the World*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 109-129.
- Bernal, M.P., Clemente, R., Walker, D.J., 2006. The role of organic amendment in the bioremediation of heavy metal-polluted soils. En: Gore, R.W. Ed, *Environmental Research at the Leading Edge*. Nova Pub., Nueva York. pp 2-58.
- Bernal, M.P., Clemente, R., Vázquez, S., Walker, D.J., 2007. Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Ecosistemas* 16: 67-76.

- Bettinelli, M., Beone, G.M., Spezia, S., Baffi, C., 2000. Determination of heavy metals in soils and sediments by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry analysis. *Analytica Chimica Acta* 424: 289-296.
- Bhattacharjee, H., Rosen, B.P., 2007. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. In: Nies, D.H., Silver, S., Eds. *Molecular microbiology of heavy metals*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 371–406.
- Bhattacharya, P., Welch, A.H., Stollenwerk, K.G., McLaughlin, M.J., Bundschuh, J., Panaullah, G., 2007. Arsenic in the environment: biology and chemistry. *Science of the Total Environment* 379: 109-120.
- Bissen M, Frimmel F.H. 2003. Arsenic- a review. Part I; Occurrence, toxicity, speciation, mobility. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31: 1, 9-18.
- BOE (Boletín Oficial del Estado), 2000. Real Decreto 995/2000, de 2 de junio, por el que se fijan objetivos de calidad para determinadas sustancias contaminantes y se modifica el Reglamento de Dominio Público Hidráulico, aprobado por el Real Decreto 846/1986, pp. 21558-21562.
- BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía), 1999. Sevilla, 12 de enero de 1999, número 5, pp. 408-409.
- Boyd, R.S., 2007. The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant & Soil* 293: 153-176.
- Branquinho, C., Serrano, H.C., Pinto, M.J., Martins-Louçao, M.A., Revisiting the plant hyperaccumulation criteria to rare plants and earth abundant elements. *Environmental Pollution* 146: 437-443.
- Bunzl, K., Trautmannsheimer, M., Schramel, P., Reifenhäuser, W., 2001. Availability of arsenic, copper, lead, thallium, and zinc to various vegetables grown in slag-contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 30: 934–939.
- Burriel, F., Lucena, F., Arribas, S., Hernández, J., 1999. *Química Analítica Cualitativa*. Paraninfo, Madrid. Apéndice VI.
- Cabrera, F., Clemente, L., Díaz Barrientos, E., López, R., Murillo, J.M., 1999. Heavy metal pollution of soils affected by the Guadiamar toxic flood. *Science of the Total Environment* 242: 117-129.
- Cairns Jr, J., 2000. Setting ecological restoration goals for technical feasibility and scientific validity. *Ecological Engineering* 15, 171-180.
- Cánovas, D., de Lorenzo, V., 2007. Osmotic stress limits arsenic hypertolerance in *Aspergillus* sp. P37. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 258-263
- Cao, X., Ma, L.Q., Shiralipour, A., 2003. Effects of compost and phosphate amendments on arsenic mobility in soils and arsenic uptake by the hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution* 126:157–167.
- Cao, X., Ma, L.Q., Tu, C., 2004. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environmental Pollution* 128: 317-325.
- Carbonell-Barrachina, A.A., Aarabi, M.A., DeLaune, R.D., Gambrell, R.P., Patrick Jr., W.H., 1998. The influence of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration. *Plant & Soil* 198: 33–43.

- Carbonell-Barrachina, A.A., Burló, F., Valero, D., López, E., Martínez-Romero, D., Martínez-Sánchez, F., 1999. Arsenic toxicity and accumulation in turnip as affected by arsenic chemical speciation. *Journal of Agricultural Food & Chemistry* 47: 2288–2294.
- Carbonell-Barrachina, A.A., Rocamora, A., García, C., 2004. Arsenic and zinc biogeochemistry in pyrite mine water from the Aznalcóllar environmental disaster. *Geoderma* 122: 195-203.
- Carpén, R.O., Pérez Sanz, A., Vázquez, S., Moreno, E., Peñalosa, J., Hernández, L.E., Alarcón, R., García, P., Lobo, M.C., 2008. Respuesta de *Silene vulgaris* en suelos contaminados con arsénico y metales pesados. Capacidad fitorrecuperadora. En: *Actas XII Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas*. Granada.
- Catarecha, P., Segura, M.D., Franco-Zorrilla, J.M., García-Ponce, B., Lanza, M., Solano, R., Paz-Ares, J., Leyva, A., 2007. A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell* 19: 1123-1133.
- Cattani, I., Capri, E., Boccelli, R., del Re, A.A.M., Assessment of arsenic availability to roots in contaminated Tuscany soils by diffusive gradients in thin films (DGT) method and uptake by *Pteris vittata* and *Agrostis castellana*. *European Journal of Soil Science* 60: 539-548.
- Chaney, R.L., Malik, K.M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 279 – 284.
- Chaney, R.L., 1989. Toxic element accumulation in soils and crops: protecting soil fertility and agricultural food chains. En: *Inorganic Contaminants in the Vadose Zone*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 140-158.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., Sparks, D.L., 2007. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality* 36: 1429-1443.
- Chang, P., Kim, J.-Y., Kim, K.-W., 2005. Concentrations of arsenic and heavy metals in vegetation at two abandoned mine tailings in South Korea. *Environmental Geochemistry & Health* 27: 109-119.
- Chen, B. D., Xiao, X. Y., Zhu, Y. G., Smith, F. A., Xie, Z. M., Smith, S. E., 2007. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn. *The Science of the Total Environment* 379: 226–234.
- Cheng, H., Hu, Y., Luo, J., Zhao, J., 2008. Geochemical processes controlling fate and transport of arsenic in acid mine drainage (AMD) and natural systems. *Journal of Hazardous Materials* 165: 13-26.
- Christophersen, H.M., Smith, S.E., Pope, S., Smith, F.A., 2009. No evidence for competition between arsenate and phosphate for uptake from soil by medic or barley. *Environment International* 35: 485-490.
- Clarkson, D.T., 1967. Interactions between aluminium and phosphorus on root surfaces and cell wall material. *Plant & Soil* 27: 347-356.
- Clemens, S., Palmgren, M., Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7: 309-315.
- Clemente, R., Walker, D.J., Bernal, M.P., 2004. Uso de enmiendas orgánicas en la fitorrecuperación de suelos contaminados por metales pesados. *Rapid Centro Color*, Murcia, España.
- Clemente, R., Walker, D.J., Bernal, M.P., 2005. Uptake of heavy metals and As by *Brassica napus* grown in contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): The effects of soil amendments. *Environmental Pollution* 138: 46-58.

- Clemente, R., Escolar, A., Bernal, M.P., 2006a. Heavy metals fractionation and organic matter mineralisation in contaminated calcareous soil amended with organic materials. *Bioresource Technology* 97: 1894-1901.
- Clemente, R., Almela, C., Bernal, M.P., 2006b. A remediation strategy based on active phytoremediation followed by natural attenuation in a soil contaminated by pyrite waste. *Environmental Pollution* 143: 397-406.
- Clemente, R., Dickinson, N.M., Lepp, N.W., 2008. Mobility of metals and metalloids in a multi-element contaminated soil 20 years after cessation of the pollution source activity. *Environmental Pollution* 155:254-261.
- Conesa, H.M., Robinson, B.H., Schulin, B., Nowack, B., 2008. Metal extractability in acidic and neutral mine tailings from the Cartagena-La Unión Mining District (SE Spain). *Applied Geochemistry* 23: 1232-1240.
- Cullen, W.R., Reimer, K.J., 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* 89, 713–764.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* 13: 393-397.
- Cunningham, S.D., Ow, D.W., 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110: 715-719.
- Dahmani, H., van Oort, F., Gélie, B., Balabane, M., 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* 109: 231-238.
- Davies-McConchie, F., McConchie, D., Clark, M., Lin, C., Pope, S., Ryffel, T., 2002. A new approach to the treatment and management of sulphidic mine tailings, waste rock and acid mine drainage. *New Zealand Mining*, 31: 7-15.
- Davison, C.M., Ferreira, P.C.S., Ure, A.M., 1999. Some sources of variability in application of the three-stage sequential extraction procedure recommended by BCR to industrially-contaminated soil. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 363: 446–451.
- De Brouwere, K., Smolders, E., Merckx, R., 2004. Soil properties affecting solid-liquid distribution of As(V) in soils. *European Journal of Soil Science* 55: 165-173.
- De la Fuente, C., Alburquerque, J.A., Clemente, R., Martínez-Alcalá, I., Bernal, M.P., 2009. Estrategias de Recuperación de Suelos Enriquecidos con Arsénico en la Provincia de Segovia. *Imprenta Comercial Segoviana, Segovia, España*.
- De la Fuente, C., Clemente, R., Bernal, M.P., 2008. Changes in metal speciation and pH in olive processing waste and sulphur-treated contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 207-215.
- DEFRA, 2002. Soil Guideline Values for Arsenic Contamination. Environmental Agency, Bristol, UK.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology* 107: 315-321.
- Delnomdedieu, M., Basti, M.M., Otvos, J.D., Thomas, D.J., 1994. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione – a magnetic resonance study. *Chemico-Biological Interactions* 90: 139–155.
- Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J., Salt, D., Senecoff, J.F., Sashti, N.A., Meagher, R.B., 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. *Natural Biotechnology* 20: 1140-1145.

- Dhankher, O.P., Rosen, B.P., McKinney, E.C., Meagher, R.B., 2006. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 5413–5418.
- Dickinson, N.M., Baker, A.J.M., Doronilla, A., Laidlaw, S., Reeves, R.D., 2009. Phytoremediation of inorganics: realism and synergies. *International Journal of Phytoremediation* 11, 97-114.
- Doménech, C., Ayora, C., de Pablo, J., 2002. Sludge weathering and mobility of contaminants in soil affected by the Aznalcóllar tailing dam spill (SW Spain). *Chemical Geology* 190: 355-370.
- Domínguez, M.T., Marañón, T., Murillo, J.M., Schulin, R., Robinson, B.H., 2008. Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar Valley, SW Spain: A large-scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution* 152: 150-159.
- Doucleff, M., Terry, N., 2002. Pumping out the arsenic. *Natural Biotechnology* 20: 1094–1095.
- Duan, G.L., Zhu, Y.-G., Tong, Y.P., Cai C., Kneer, R., 2005. Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator. *Plant Physiology* 138: 461–469.
- EC (European Community), 2002. Towards a Thematic Strategy for Soil protection. COM(2002)179final. Brussels, Belgium: European Commission.
- Elke, M.L., Lorentzen, Kingston, H.M., 1996. Comparison of microwave-assisted and conventional leaching using EPA method 3050B. *Analytical Chemistry* 68: 4316-4320.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C., 2008a. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology* 39: 299-310.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C., 2008b. Effects of chelates on plants and soil microbial community: Comparison of EDTA and EDDS for lead phytoextraction. *Science of the Total Environment* 401: 21-28.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Mijangos, I., Garbisu, C., 2009a. Evaluation of the efficiency of a phytostabilization process with biological indicators of soil health. *Journal of Environmental Quality* 38: 2041-2049.
- Epelde, L., Mijangos, I., Becerril, J.M., Garbisu, C., 2009b. Soil microbial community as bioindicator of the recovery of soil functioning derived from metal phytoextraction with sorghum. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 1788-1794.
- Ernst, W.H.O., Nelissen, H.J.M., Ten Bookum, W.M., 2000. Combination toxicology of metal enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. *Environmental and Experimental Botany* 43: 55–71.
- Ernst, W.H.O., 2005. Phytoextraction of mine wastes – Options and impossibilities. *Chemie der Erde* 65:29–42.
- Ernst, W.H.O., Krauss, G.-J., Verkleij, J.A., Wesenberg, D., 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant, Cell & Environment* 31: 123-143.
- Espigares, T., López-Pintor, A., Rey Benayas, J.M., 2004. Is the interaction between *Retama sphaerocarpa* and its understorey herbaceous vegetation always reciprocally positive? Competition–facilitation shift during *Retama* establishment. *Acta Oecologica* 26: 121-128.

- Esteban, E., Carpena, R.O., Meharg, A.A., 2003. High-affinity phosphate/arsenate transport in white lupin (*Lupinus albus*) is relatively insensitive to phosphate status. *New Phytologist* 158: 165-173.
- Esteban, E., Moreno, E., Peñalosa, J., Cabrero, J.I., Millán, R., Zornoza, P., 2008. Short and long-term uptake of Hg in white lupin plants: Kinetics and stress indicators. *Environmental and Experimental Botany* 62: 316-322.
- Fa, J.E., Sharples, C.M., Bell, D.J., 1999. Habitat correlates of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) distribution after the spread of RVHD in Cadiz Province, Spain. *Journal of Zoology* 249: 83-96.
- Fayiga, A.O., Ma, L.Q., 2006. Using phosphate rock to immobilize metals in soil and increase arsenic uptake by hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Science of the Total Environment* 359: 17-25.
- Fellet, G., Marchiol, L., Perosa, D., Zerbi, G., 2007. The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders. *Ecological Engineering* 31: 207-214.
- Feng, M. H., Shan, X. Q., Zhang, S. Z., Wen, B., 2005. Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere* 59: 939-949.
- Fernández-Gálvez, J., Barahona, E., Iriarte, A., Mingorance, M.D., 2007. A simple methodology for evaluation of groundwater pollution risk. *Science of the Total Environment* 378: 67-70.
- Fixen, P.E., Grove, J.H., 1990. Testing soils for phosphorus. En: *Soil Testing and Plant Analysis*, 3ª Edición, Westerman, R.L. (Ed.). Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA. pp. 141-180.
- Fitz, W.J., Wenzel, W.W., 2002. Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology* 99: 259-278.
- Fitz, W.J., Wenzel, W.W., Zhang, H., Nurmi, J., Stipek, K., Fischerova, Z., Schweiger, P., Köllensperger, G., Ma, L.Q., Stingeder, G., 2003. Rhizosphere characteristics of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and monitoring of phytoremoval efficiency. *Environmental Science & Technology* 37: 5008-5014.
- Fitz, W.J., Wenzel, W.W., 2006. Sequestration of arsenic by plants. En: Naidu, R., y col. Eds. *Managing Arsenic in the Environment. From Soils to Human Health*. CSIRO Pub., Collingwood, Australia, pp. 209-222.
- Frankenberger J.W.T., ed. *Environmental chemistry of arsenic*. New York, NY, USA: Marcel Dekker, pp. 183-215.
- Franzluebbers, K., Weaver, R.W., Juo, A.S.R., Franzluebbers, A.J., 1994. Carbon and nitrogen mineralization from cowpea plants part decomposing in moist and in repeatedly dried and wetted soil. *Soil Biology & Biochemistry* 26: 1379-1387.
- French, C.J., Dickinson, N.M., Putwain, P.D., 2006. Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environmental Pollution* 141: 387-395.
- Frost, R.R., Griffin, R.A., 1977. Effect of pH on adsorption of arsenic and selenium from landfill leachate by clay minerals. *Soil Science Society of America Journal* 41: 53-57.
- Fuentes, D., Disante, K.B., Valdecantos, A., Cortina, J., Vallejo, V.R., 2007. Sensitivity of Mediterranean woody seedlings to copper, nickel and zinc. *Chemosphere* 66: 412-420.
- Gadepalle, V.P., Ouki, S.K., Van Herwijnen, R., Hutchings, T., 2007. Immobilization of heavy metals in soil using natural and waste materials for vegetation establishment on contaminated sites. *Soil & Sediments Contamination* 16: 233-251.

- Galán, E., González, I., Fernández-Caliani, J.C., 2002. Residual pollution load in soils impacted by the Aznalcóllar (Spain) mining spill after clean-up operations. *Science of the Total Environment* 286: 167-179.
- Galán Ceta, P., Gamarra Gamarra, R., García Viñas, J.I., 2003. Árboles y Arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. 4ª Edición. Ediciones Jaguar, Madrid.
- García, C., Hernández, M.T., Pascual, J.A., Moreno, J.L., Ros, M., 2000. Actividad microbiana en suelos del Sureste español sometidos a procesos de degradación y desertificación. Estrategias para su rehabilitación. En: Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España. García, C. y Hernández, M.T., editores. Tipografía San Francisco, Murcia.
- García, C., Hernández, T., 2003. Microbial activity in degraded soils under semiarid climate. Changes in their rehabilitation. En: Preserving Soil Quality and Soil Diversity. Lobo, M.C. y Ibañez, J.J. editores. S.C. Artes Gráficas, Zaragoza. pp. 83-98.
- García, C., Roldán, A., Hernández, T., 2005. Ability of different plant species to promote microbiological processes in semiarid soil. *Geoderma* 124: 193-202.
- García, I., Díez, M., Martín, F., Simón, M., Dorronsoro, C., 2009. Mobility of arsenic and heavy metals in a Sandy-loam textured and carbonated soil. *Pedosphere* 19: 166-175.
- García-Izquierdo, C., Gil-Sotres, F., Hernández-Fernández, M.T., Trasar-Cepeda, C., 2003. Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medidas de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana. Tipografía San Francisco, Murcia.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., de la Rosa, G., Parsons, J.G., 2005. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* 249: 1797-1810.
- Germida, J.J., Janzen, H.H., 1993. Factors affecting the oxidation of elemental sulphur in soils. *Fertilizer Research* 35: 101-114.
- Geng, C.N., Zhu, Y.G., Tong, Y.P., Smith, S.E., Smith, F.A., 2006. Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 62, 608-615.
- Gionocchio, R., Carvallo, G., Toro, I., Bustamante, E., Silva, Y., Sepúlveda, N., 2004. Micro-spatial variation of soil metal pollution and plant recruitment near a copper smelter in Central Chile. *Environmental Pollution* 127: 343-352.
- Goldberg, S., Glaubig, R.A., 1998. Anion sorption on a calcareous, montmorillonitic soil – arsenic. *Soil Science Society of America Journal* 52, 1154-1157.
- Gonzaga, M.I.S., Gonzaga-Santos, J.A., Ma, L.Q., 2006. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. *Scientia Agrícola* 36: 90-101.
- González-Chávez, C., Harris, P.J., Dood, J., Meharg, A.A., 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenic resistance on *Holcus lanatus*. *New Phytologist* 155: 163-171.
- Gräfe, M., Sparks, D.L., 2006. Solid phase speciation of arsenic. En: Naidu, R., y col. Eds. Managing Arsenic in the Environment. From Soils to Human Health. CSIRO Pub., Collingwood, Australia, pp. 75-92.
- Gulz, P.A., Gupta, S.K., Schulin, R., 2005. Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils. *Plant & Soil* 272: 337-347.

- Gupta, S.K., Aten, C., 1993. Comparison and evaluation of extraction media and their suitability in a simple model to predict the biological relevance of heavy metal concentrations in contaminated soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51: 25–46.
- Hamon, R.E., Holm, P.E., Lorenz, S.E., McGrath, S.P., Christensen, T.H., 1999. Metal uptake by plants from sludge-amended soils: caution is required in the plateau interpretation. *Plant & Soil* 216: 53–64.
- Hansel, C.M., La Force, M.J., Fendorf, S., Sutton, S., 2002. Spatial and temporal association of As and Fe species on aquatic plant roots. *Environmental Science & Technology* 36: 1988–1994.
- Hartikainen, H., 1986. Acid- and base titration behaviour of Finnish mineral soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 149: 522–532.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A.A., 2001. Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant, Cell & Environment* 24: 713–722.
- Hartley-Whitaker, J., Woods, C., Meharg, A.A., 2002. Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*? *New Phytologist* 155: 219–225.
- Hartley, W., Edwards, R., Lepp, N.W., 2004. Arsenic and heavy metal mobility in iron oxide-amended contaminated soils as evaluated by short- and long-term leaching tests, *Environmental Pollution* 131: 495–504.
- Hartley, W., Lepp, N.W., 2008. Remediation of arsenic contaminated soils by iron-oxide application, evaluated in terms of plant productivity, arsenic and phytotoxic metal uptake. *Science of the Total Environment* 390: 35–44.
- Hartley, W., Dickinson, N.M., Clemente, R., French, C., Pearce, T.G., Sparke, S., Lepp, N.W., 2009a. Arsenic stability and mobilization in soil at an amenity grassland overlying chemical waste (St. Helens, UK). *Environmental Pollution* 157: 847–856.
- Hartley, W., Dickinson, N.M., Riby, P., Lepp, N.W., 2009b. Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environmental Pollution* 157: 2654–2662.
- Haynes, R.J., 1983. Soil acidification induced by leguminous crops. *Grass & Forage Science* 38: 1–11.
- Hevia, A., 2007. Estudio de la Contaminación Residual en Suelos Afectados por los Vertidos de Aznalcóllar. Proyecto Fin de Carrera de Ciencias Ambientales, UAM.
- Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., Rodríguez-Maroto, J.M., García-Ruiz, R., 2008. Effects of pyrite sludge pollution on soil enzyme activities: Ecological dose–response model. *Science of the Total Environment* 396: 89–99.
- Hinojosa, M.B., Rodríguez-Maroto, J.M., Viñegla, B., Carreira, J.A., 2004. Microbiological rates and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcóllar toxic spill. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1637–1644.
- Horswell, J., Speir, T., 2006. Arsenic phytotoxicity. En: Naidu, R., y col. Eds. *Managing Arsenic in the Environment. From Soils to Human Health*. CSIRO Pub., Collingwood, Australia, pp. 183–208.
- Hokura, A., Omuma, R., Tereda, Y., Kitajima, N., Abe, T., Saito, H., Yoshida, S., Nakai, I., 2006. Arsenic distribution and speciation in an arsenic hyperaccumulator fern by X-ray spectroscopy utilizing a synchrotron radiation source. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21: 321–328.

- Huang, R., Gao, S., Wang, W., Staunton, S., Wang, G., 2006. Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, southeast China. *Science of the Total Environment* 368: 531-541.
- Huang, Z.C., Chen, T.B., Lei, M., Liu, Y.R., Hu, T.D., 2008. Difference of toxicity and accumulation of methylated and inorganic arsenic in arsenic-hyperaccumulating and -hypertolerant plants. *Environmental Science & Technology* 42: 5106–5111.
- Inskeep, W.P., McDermott, T.R., Fendorf, S., 2002. Arsenic (V)/(III) cycling in soils and natural waters: chemical and microbiological processes. In: Frankenberger Jr, W.T., Ed., *Environmental Chemistry of Arsenic*, Marcel Dekker, New York, pp. 183–215.
- Isayenkov SV, Maathuis FJM. 2008. The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. *FEBS Letters* 582: 1625–1628.
- Jadia, C.D., Fulekar, M.H., 2009. Phytoremediation of heavy metals: recent techniques. *African Journal of Biotechnology* 8: 921-928.
- Jain, M., Gadre, R.P., 1997. Effect of As on chlorophyll and protein contents and enzymic activities in greening maize tissues. *Water, Air, & Soil Pollution* 93: 109–115.
- Jain, A., Raven, K.P., Loeppert, R.H., 1999. Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: surface charge reduction and net OH-release stoichiometry. *Environmental Science & Technology* 33: 1179–1184.
- Jiménez, R., Jordá, L., Jordá, R., Prado, P., 2004. La minería metálica en Madrid. *Bocamica* 14:50-89.
- Juárez Sanz, M., Sánchez Andreu, J., Sánchez Sánchez, A., 2006. *Química del Suelo y Medio Ambiente*. Publ. Universidad de Alicante. San Vicente del Raspeig, Alicante, España.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1992. *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 365.
- Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-plant transfer of trace elements-an environmental issue. *Geoderma* 122:143-149.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M.P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R., Monterroso, C., 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: implications on phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* 67: 243-259.
- King, D.J., Doronila, A.I., Feenstra, C., Baker, A.J.M., Woodrow, I.E., 2008. Phytostabilisation of arsenical gold mine tailings using four *Eucalyptus* species: Growth, arsenic uptake and availability after five years. *Science of the Total Environment* 406: 35-42.
- Kirchmann, H., Bergqvist, R., 1989. Carbon and nitrogen mineralization of white clover plants (*Trifolium repens*) of different age during aerobic incubation with soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 152: 283-288.
- Kloke, A., Sauerbeck, D.R., Vetter, H., 1984. The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. In: Nriagu J (ed) *Changing metal cycles and human health*. Springer, Berlin, pp. 113–141.
- Ko, B.-G., Anderson, C.W.N., Bolan, N.S., Huh, K.-Y., Vogeler, I., 2008. Potential for the phytoremediation of arsenic-contaminated mine tailings in Fiji. *Australian Journal of Soil Research* 46: 493-501.

- Knudson, J.A., Meikle, T., DeLuca, T.H., 2003. Role of mycorrhizal fungi and phosphorus in the arsenic tolerance of the basin wildrye. *Journal of Environmental Quality* 32: 200-206.
- Krämer, U., 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 133–141.
- Kumpiene, J., Montesinos, I.C., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2007. Evaluation of the critical factors controlling stability of chromium, copper, arsenic and zinc in iron-treated soil. *Chemosphere* 67: 410-417.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments-A review. *Waste Management* 28: 215-225.
- Lakshmipathiraj, B.R.V., Narasimhan, S., Prabhakar, S., 2006. Absorption of arsenate on synthetic goethite from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 136: 281-287.
- Lasat, M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31: 109-120.
- Latch, G.C.M., 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 44: 143-156.
- Lepp, N.W. 1981. Effect of heavy metals pollution on plants. Vol. 1. Effects of trace metal on plant function. Applied Science Publishers, London & New Jersey.
- Lepp, N.W., Dickinson, N.M., 1998. Biological interactions: The role of woody plants in phytoremediation. En: Vangronsveld, J., Cunningham, S.D., Eds. *Metal contaminated Soils: In situ inactivation and phytoremediation*. Springer, Berlin, pp. 67-73.
- Lepp, N.W., Madejón, P., 2007. Cadmium and zinc in vegetation and litter of a voluntary woodland that has been developed on contaminated sediment-derived soil. *Journal of Environmental Quality* 36: 1123-1131.
- Leung, H.M.; Ye, Z.H.; Wong, M.H., 2006. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) in As-contaminated soils. *Environmental Pollution* 2006: 139, 1–8
- Lin, A., Zhang, X., Zhu, Y.G., Zhao, F.J., 2008. Arsenate-induced toxicity: effects on antioxidative enzymes and DNA damage in *Vicia faba*. *Environmental Toxicology & Chemistry* 27: 413-419.
- Lin, Z., Puls, R.W., 2000. Adsorption, desorption and oxidation of arsenic affected by clay minerals and aging processes. *Environmental Geology* 39: 753-759.
- Lindsay, W.L., 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. Wiley-Interscience, New York.
- Liu, W.J., Zhu, Y.G., Hu, Y., Williams, P.N., Gault, A.G., Meharg, A.A., Charnock, J.M., Smith, F.A., 2006. Arsenic sequestration in iron plaque, its accumulation and speciation in mature rice plants (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science & Technology* 40: 5730–5736.
- Liu, W.J., Zhu, Y.G., Smith, F.A., Smith, S.E., 2004. Do phosphorus nutrition and iron plaque alter arsenate (As) uptake by rice seedlings in hydroponic culture? *New Phytologist* 162: 481–488.
- Liu, Y., Zhu, Y. G., Chen, B. D., Christie, P., Li, X. L., 2005. Yield and arsenate uptake of arbuscular mycorrhizal tomato colonized by *Glomus mosseae* BEG167 in As spiked soil under glasshouse conditions. *Environment International* 31: 867–873.
- Livesey, N.T., Huang, P.M., 1981. Adsorption of arsenate by soils and its relation to selected properties and anions. *Soil Science* 131, 88-94.

- Lobo, M.C., 2007. Procesos de degradación del suelo. En: R Millán, MC Lobo. Contaminación de Suelos. Tecnologías para su recuperación. Editorial CIEMAT. Madrid, Spain, pp. 27-36.
- Lombi, E., Wenzel, W.W., Sletten, R.S., 1999. Arsenic adsorption by soils and iron-coated sand: kinetics and reversibility. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 162, 451-456.
- Lozano-Rodríguez, E., Luguera, M., Lucena, J.J., Carpena-Ruiz, R.O., 1995. Evaluation of two different acid digestion methods in closed systems of trace elements determination in plants. *Química Analytica* 14, 27-30.
- Madejón, E., Perez de Mora, A., Felipe, E., Burgos, P., Cabrera, F., 2006a. Soil amendments reduce trace element solubility in a contaminated soil and allow regrowth of natural vegetation. *Environmental Pollution* 139: 40-52.
- Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J.M., Robinson, B., 2006b. In defence of plants as biomonitors of soil quality. *Environmental Pollution* 143: 1-3.
- Madejón, P., Murillo, J.M., Marañón, T., Espinas, J.L., Cabrera, F., 2006c. Accumulation of As, Cd and selected trace elements in tubers of *Scirpus maritimus* L. from Doñana marshes (South Spain). *Chemosphere* 64: 742-748.
- Madejón, P., Lepp, N.W., 2007. Arsenic in soils and plants of woodland regenerated on an arsenic-contaminated substrate: A sustainable natural remediation? *Science of the Total Environment* 379: 256-262.
- Madejón, P., Burgos, P., Cabrera, F., Madejón, E., 2009. Phytostabilization of amended soils polluted with trace elements using the Mediterranean shrub: *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Phytoremediation* 11: 542-557.
- Manning, B.A., Goldberg, S., 1997. Arsenic (III) and arsenic (V) adsorption on three California soils. *Soil Science* 162: 886-895.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), 1994. Métodos oficiales de análisis: Tomo III. Secretaría General Técnica. Madrid, Spain.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, San Diego.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., Bergmann, H., 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science* 163: 961-969.
- Marin, A.R., Masscheleyn, P.H., Patrick, W.H., 1992. The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. *Plant & Soil* 139: 175-183.
- Mariano, E.D., Keljten, W.G., 2003. Evaluating the root of citrate exudation as mechanism of aluminium resistance in maize. *Plant y Soil* 256: 469-479.
- Martín, F., Díez, M., García, I., Simón, M., Dorronsoro, C., Iriarte, A., Aguilar, J., 2007. Weathering of primary minerals and mobility of major elements in soils affected by an accidental spill of pyrite tailing. *The Science of the Total Environment* 378: 49-52.
- Martínez-Alcalá, I., Clemente, R., Bernal, M.P., 2009. Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. growing in a high-metal calcareous soil. *Water, Air, & Soil Pollution* 201: 283-293.

- Martínez-Iñigo, M.J., Pérez-Sanz, A., Ortiz, I., Alonso, J., Alarcón, R., García, P., Lobo, M.C., 2009. Bulk soil and rhizosphere bacterial community PCR–DGGE profiles and β -galactosidase activity as indicators of biological quality in soils contaminated by heavy metals and cultivated with *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Chemosphere* 75: 1376-1381.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., Bergmann, H., 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science* 163: 961-969.
- Matschullat, J., 2000. Arsenic in the geosphere – a review. *Science of the Total Environment* 249: 297-312.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils, *Current Opinion in Biotechnology* 14: 277-282.
- McLaren, R.G., Megharaj, M., Naidu, R., 2006. Fate of arsenic in the soil environment. En: Naidu R. y col. Eds. *Managing Arsenic in the Environment. From Soil to Human Health*. CSIRO Publishing, Australia. pp. 157-182.
- Meers, E., Van Slyken, S., Adriaensen, K., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Du Laing, G., Thewys, T., Tack, F.M.G., 2010. The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for 'phytoattenuation' of heavy metals on moderately contaminated soils: A field experiment. *Chemosphere* 78: 35-41.
- Mehra, O.P., Jackson, M.L., 1960. Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays & Clay Minerals* 7: 317-327.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R., 1992. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany* 43: 519–524.
- Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist* 154: 29–43.
- Mello, J.W.V., Roy, W.R., Talbott, J.L., Stucki, J.W., 2006. Mineralogy and arsenic mobility in arsenic-rich Brazilian soil and sediments. *Journal of Soil & Sediments* 6: 9-19.
- Mench, M., Bussiere, S., Vangronsveld, J., Manceau, A., 2003. Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after in-situ treatments. *Plant y Soil* 249: 187–202.
- Mench, M., Schwitzguébel, J.-P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., Gupta, S., 2009. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification, and sequestration, and consequences to food safety. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 876-900.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.-P., Gawronski, S.W., Schöder, P., Vangronsveld, J., 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils & Sediments*, en prensa, DOI 10.1007/s11368-010-0190-x.
- Mendez M.O., Maier, R.M., 2008. Phytoremediation of mine tailings in arid and semiarid environments-and emerging remediation technology. *Environmental Health Perspective* 116: 278-283.
- Mengel, K., Kirkby, E.A., 2001. *Principles of Plant Nutrition*. Kluwer Ac. Publ. Dordrecht, Países Bajos.
- Menzies, N.W., Donn, M.J., Kopittke, P.M., 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution* 145: 121-130.

- Mertens, J., Vervaeke, P., De Schrijver, A., Luyssaert, S., 2004. Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of the Total Environment* 326: 209-215.
- Mertens, J., Van Nevel, L., De Schrijver, A., Piesschaert, F., Oosterbaan, A., Tack, F.M.G., Verheyen, K., 2007. Tree species effect on the redistribution of soil metals. *Environmental Pollution* 149: 173.
- Mihaljevic, M., Ettler, V., Sistr, L., Sebek, O., Strand, L., Vonáskova, V., 2009. Effect of low concentrations of phosphate ions on extraction of arsenic from naturally contaminated soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 83: 422-427.
- Milton, A., Johnson, M., 1999. Arsenic in the food chains of a revegetated metalliferous mine tailings pond. *Chemosphere* 39: 765-779.
- Mimura, T., 1999. Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology – a Survey of Cell Biology* 191: 149–200.
- Montes, C., 2002. Lecciones aprendidas en tres años de restauración de ecosistemas en el corredor verde del Guadamar. *Ecosistemas*, año XI.
- Moreno, E., Carpena Ruiz, R.O., Esteban, E., 2007. La contaminación de suelos por metales pesados. En: R Millán, MC Lobo. *Contaminación de Suelos. Tecnologías para su recuperación*. Editorial CIEMAT. Madrid, Spain. pp 187-200.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Esteban, E., Carpena, R.O., 2007. Mercury accumulation and resistance to mercury stress in *Rumex induratus* and *Marrubium vulgare* grown on perlite. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170: 485–494.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Carpena-Ruiz, R.O., Esteban, E. 2008. Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere* 71: 466-473.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Manzano, R., Carpena-Ruiz, R.O., Gamarra, R., Esteban, E., 2009. Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. *Journal of Hazardous Materials* 162: 854-859.
- Natural Resources Conservation Service, 1999. *Soil Taxonomy. A basic system of soil classification for making in interpreting soil surveys*, second ed. USDA, Washington.
- Nowack, B., Schulin, R., Robinson, B.H., 2006. Critical assessment of chelatatant-enhanced metal phytoextraction. *Environmental Science & Technology* 40: 5225-5232.
- Novozamsky, I., Lexmond, T.H.M., Houba, V.J.G., 1993. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51: 47–58.
- Ongley, L.K., Sherman, L., Armienta, A., Concilio, A., Ferguson Salina, C., 2007. Arsenic in the soils of Zimapán, México. *Environmental Pollution* 145: 793-799.
- Onken, B.M., Adriano, D.C., 1997. Arsenic availability in soil with time under saturated and subsaturated conditions. *Soil Science Society American Journal* 61: 746-752.
- Orden 2720/2006, de 11 de agosto, por la que se establecen niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos de traza de suelos contaminados de la Comunidad de Madrid. Modificada por Orden 741/2007.

- Padmavathiamma, P.K., Li, L.Y., 2007. Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, & Soil Pollution* 184: 105-126.
- Päivöke, A., Simola, L.K., 2001. Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 49: 111–121.
- Pereira, R., Marques, S.M., Antunes, S.C., Marques, C., Abrantes, N., Teixeira, J.L., Gonçalves, F., Comparison of portuguese soils from different geographical regions using physicochemical, biological and biochemical parameters. *Journal of Soils & Sediments* 8: 106-115.
- Peryea, E.J., Kammereck, R., 1997. Phosphate-enhanced movement of arsenic out of lead arsenate-contaminated topsoil and through uncontaminated subsoil. *Water, Air, & Soil Pollution* 93:243-254.
- Pérez-de-Mora, A., Madejón, E., Cabrera, F., Buegger, F., Fuß, R., Pritsch, K., Scholter, M., 2008a. Long-term impact of acid resin waste deposits on soil quality of forest areas I. Contaminants and abiotic properties. *Science of the Total Environment* 406: 88-98.
- Pérez-de-Mora, A., Madejón, E., Cabrera, F., Buegger, F., Fuß, R., Pritsch, K., Scholter, M., 2008b. Long-term impact of acid resin waste deposits on soil quality of forest areas II. Biological indicators. *Science of the Total Environment* 406: 99-107.
- Peñalosa, J.M., Carpena, R.O., Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M.J., Esteban, E., 2007. Chelate-assisted phytoextraction of heavy metals in a soil contaminated with a pyritic sludge. *Science of the Total Environment* 378: 199-204.
- Peuke, A.D., Rennenberg, H., 2005. Phytoremediation. *EMBO Reports* 6: 497-501.
- Pickering, I.J., Prince, R.C., George, M.J., Smith, R.D., George, G.N., Salt, D.E., 2000. Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. *Plant Physiology* 122: 1171–1178.
- Pickering, I.J., Gumaelius, L., Harris, H.H., Prince, R.C., Hirsch, G., Banks, J.A., Salt, D.E., George, G.N., 2006. Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern. *Environmental Science & Technology* 40: 5010–5014
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annual Reviews in Plant Biology* 56: 15–39.
- Porta, J., López-Acebedo, M., Roquero, C., 2003. *Edafología para la Agricultura y el Medio Ambiente*. 3ª Edición. Mundi Prensa, Madrid.
- Poschenrieder, C., Toldrá, R., Barceló, J., 2006, Can metals defend plants against biotic stress? *Trends in Plant Sciences* 11: 288-295.
- Prasad, M.N.V., Freitas, H., Fraenzle, S., Wuenschmann, S., Markert, B., 2010. Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions. *Environmental Pollution* 158: 18-23.
- Raab, A., Schat, H., Meharg, A.A., Feldmann, J., 2005. Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatine complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytologist* 168: 551–558.
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 221-226.
- Raab, A., Feldmann, J., Meharg, A.A., 2004. The nature of arsenic-phytochelatine complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiology* 134: 1113-1122.

- Raab, A., Schat, H., Meharg, AA, Feldmann, J., 2005. Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytologist* 168: 551–558
- Raab A, Williams PN, Meharg A, Feldmann J., 2007. Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plants. *Environmental Chemistry* 4: 197–203.
- Raghothama, K.G., 1999. Phosphate adquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 665-693.
- Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.
- Redman, A.D., Macalady, D.L., Ahmann, D., 2002. Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. *Environmental Science & Technology* 36: 2889-2896.
- Renella, G., Mench, M., Landi, L., Nannipieri, P., 2005. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 133–139.
- Renella, G., Landi, L., Valori, F., Nannipieri, P., 2007. Microbial and hydrolase activity after release of low molecular weight organic compounds by a model root surface in a clayey and sandy soil. *Applied Soil Ecology* 36: 124-129.
- Requejo, R., 2004. Tolerancia, acumulación y translocación de arsénico en plantas de maíz (*Zea mays* L.). PhD. Thesis. Universidad de Córdoba, Córdoba.
- Rey García, P., 2002. Organismos modificados genéticamente: oportunidades ambientales y dificultades políticas. *Ecosistemas*, año XI.
- Robinson, B., Schulin, R., Nowack, B., Roulier, S., Menon, M., Clothier, B., Green, S., Mills, T., 2006. Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. *Forest, Snow & Landscape Research* 80:221–234.
- Rodríguez, R.R., Basta, N.T., Casteel, S.W., Armstrong, F.P., Ward, D.C., 2003. Chemical extraction methods to assess bioavailable arsenic in soil and solid media. *Journal of Environmental Quality* 32:876–884.
- Roos, S.M., 1994. *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Roy, W.R., Hassett, J.J., Griffin, R.A., 1986. Competitive interactions of phosphate and molybdate on arsenate adsorption. *Soil Science* 142: 203-210.
- Sadiq, M., 1997. Arsenic chemistry in soils: an overview of thermodynamic prediction and field observations. *Water, Air & Soil Pollution* 93: 117-136.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A. Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I., 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13: 468-474.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 49: 643-668.
- Sastre, I., Vicente, M.A., Lobo, M.C., 1996. Influence of the application of sewage sludges on soil microbial activity. *Bioresource Technology* 57: 19-23.

- Sastre-Conde, I., Lobo, M.C., 2003. Determinación actividad ureasa en suelos. En: García, C., Hernández, T. Eds. Técnicas Biológicas. Mundi Prensa, Madrid, pp. 123-148.
- Sastre-Conde, I., Cabezas, J.G., Guerrero, A., Vicente, M.A., Lobo, M.C., 2007. Evaluation of the soil biological activity in a remediation soil assay using organic amendments and vegetal cover. *Science of the Total Environment* 378: 205-208.
- Sauvé, S., 2001. Speciation of metals in soils. En: Allen, H.E. Ed. Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants. SETAC Press, Pensacola, Florida, pp. 7-38.
- Schnoor, J.L., Licht, L.A., McCutcheon, S.C., Wolfe, N.L., Carreira, L.H., 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology* 29: 318-323.
- Schmöger, M.E.V., Oven, M., Grill, E., 2000. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology* 122: 793-802.
- Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53: 1351-1365.
- Sharples, J.M., Meharg, A.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G., 2000. Evolution: symbiotic solution to arsenic contamination. *Nature* 404: 951-952.
- Sheppard, S.C., 1992. Summary of phytotoxic levels of soil arsenic. *Water, Air, & Soil Pollution* 64: 539-550.
- Singh, A.N., Raghubanshi, A.S., Singh, J.S., 2002. Plantations as a tool for mine spoil restoration. *Current Science* 82: 1436-1441.
- Shiowatana, J., McLaren, R.G., Chanmekha, N., Samphao, A., 2001. Fractionation of arsenic in soil by a continuous-flow sequential extraction method. *Journal of Environmental Quality* 30, 1940-1949.
- Simón, M., Ortiz, I., García, I., Fernández, J., Dorronsoro, C., Aguilar, J., 1999. Pollution of soils by the toxic spill of a pyrite mine (Aznalcóllar, Spain). *Science of the Total Environment* 242: 105-115.
- Simón, M., Martín, F., García, I., Bouza, P., Dorronsoro, C., Aguilar, J., 2005. Interaction of limestone grains and acidic solutions from the oxidation of pyrite tailings. *Environmental Pollution* 135: 65-72.
- Simón, M., García, I., Martín, F., Díez, M., del Moral, F., Sánchez, J.A., 2008. Remediation measures and displacement of pollutants in soils affected by the spill of a pyrite mine. *The Science of the Total Environment*, 407: 23-39.
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., 2002. A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 17: 517-568.
- Smith, S. E., Read, D. J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, California.
- Smith, E., Naidu, R., Alston, A.M., 1999. Chemistry of arsenic in soils. I. Sorption of arsenate and arsenite by four Australian soils. *Journal of Environmental Quality* 28: 1719-1726.
- Smith, E., Naidu, R., Alston, A.M., 2002. Chemistry of inorganic arsenic in soils. II. Effect of phosphorous, sodium, and calcium on arsenic sorption. *Journal of Environmental Quality* 31: 557-563.
- Smith, S.E., Christophersen, H.M., Pope, S., Smith, A., 2010. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. *Plant & Soil* 327: 1-21.

- Sneller, F.E.C., Van Heerwaarden, L.M., Kraaijeveld-Smit, F.J.L., Koevoets, P.L.M., Schat H., Verkleij, J.A.C., 2000. Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *Journal Agricultural Food & Chemistry* 48: 4014–4019.
- Soltanpour, P. N., Workman, S., 1979. Modification of the NH_4HCO_3 -DTPA soil test to omit carbon black. A new soil test for simultaneous extraction of macro- and micronutrients in alkaline soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 8: 195–207.
- Sparks, D.L., 1995. *Environmental Soil Chemistry*. Academic Press, New York.
- Sparks, D.L., 2005. Toxic metals in the environment: the role of surfaces. *Elements* 1: 193-197.
- Srivastava, M., Ma, L.Q., Singh, N., Singh, S., 2005. Antioxidant responses of hyper-accumulators and sensitive species to arsenic. *Journal of Experimental Botany* 56: 1335–1342.
- Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Trivedi, P.K., Tandon P.K., 2007. Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Environmental Science & Technology* 41: 2930-2936.
- Stachowicz, M., Hiemstra, T., van Riemsdijk, W.H., 2008. Multi-competitive interaction of As(III) and As(V) oxyanions with Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , and CO_3^{2-} ions on goethite. *Journal of Colloid and Interface Science* 320: 400-414.
- Steinmaus, C.M., George, C.M., Kalman, D.A., Smith, A.H., 2006. Evaluation of two new arsenic field test kits capable of detecting arsenic water concentrations close to 10 $\mu\text{g/L}$. *Environmental Science & Technology* 40: 3362–3366
- Stevenson, F.J., 1982. *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley & Sons, Nueva York.
- Strawn, D., Doner, H., Zavarin, M., McHugo, S., 2002. Microscale investigation into the geochemistry of arsenic, selenium, and iron in soil developed in pyritic shale materials. *Geoderma* 108: 237– 257.
- Tarazona, J.V., Fernández, M.D., Vega, M.M., 2005. Regulation of contaminated soils in Spain. A new legal instrument. *Journal of Soils & Sediments* 5: 121-124.
- Thornton, I., Abrahams, P., 1983. Soil ingestion - a major pathway of heavy metals into livestock grazing contaminated land. *Science of the Total Environment* 28: 287-294
- Torn, M.S., Trumbore, S.E., Chadwick, O.A., P.M., 1997. Mineral control of soil organic carbon storage and turnover. *Nature* 389: 170-173.
- Tomasi, N., Weisskopf, L., Renella, G., Landi, L., Pinton, R., Varani, Z., Nannipieri, P., Torrent, J., Martinoia, E., Cesco, S., Flavonoids of white lupin roots participate in phosphorus mobilization from soil. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1971-1974.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1867-1875.
- Trotta, A., Falaschi, P., Cornara, L., Minganti, V., Fusconi, A., Drava, G., Berta, G., 2006. Arbuscular mycorrhizae increase the arsenic translocation factor in the As hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. *Chemosphere* 65: 74–81.

- Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta D.K., Maathuis, F.J.M., 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology* 25: 158–165.
- Tu, C., Ma, L.Q., 2005. Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution* 135: 333–340.
- Ultra, V.U., Tanaka, S., Sakurai, K., Iwasaki, K., 2007a. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. *Plant & Soil* 290: 29–41.
- Ultra, V.U.Y., Tanaka, S., Sakurai, K., Iwasaki, K., 2007b. Arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus aggregatum*) influences biotransformation of arsenic in the rhizosphere of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* 53: 499–508.
- Urrutia, M., Graña, J., García-Rodeja, R., Macías, F., 1987. Pyrite oxidation processes in surface systems: acidifying potential and its interest in minesoils reclamation. *Cuaderno do Laboratorio Xeolóxico de Laxe*, 11: 131-145.
- Van Nevel, L., Mertens, J., Oorts, K., and Verheyen, K., 2007. Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environmental Pollution* 150: 34-40.
- Valladares, F., Villar-Salvador, P., Domínguez, S., Fernández-Pascual, M., Peñuelas, J.L., Pugnaire, F.I., 2002. Enhancing the early performance of the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.: fertilisation versus *Rhizobium* inoculation. *Plant & Soil* 240: 253–262.
- Vamerali, T., Bandiera, M., Coletto, L., Zanetti, F., Dickinson, N.M., Mosca, G., 2009. Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environmental Pollution* 157: 887-894.
- Vanderlinden, K., Polo, M.J., Ordoñez, R., Giráldez, R., 2006. Spatiotemporal evolution of soil pH and zinc after the Aznalcóllar mine spill. *Journal of Environmental Quality* 35: 37-49.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lie, D., Mench, M., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 765-794.
- Vazquez, M.D., Barcelo, J., Poschenrieder, C., Madico, J., Hatton, P., Baker, A.J.M., Cope, G.H., 1992. Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *Journal of Plant Physiology* 140: 350–355.
- Vázquez, S., 2004. Mecanismos Fisiológicos de Resistencia al Cadmio y al Arsénico en Planta de Altramuz. Aplicación en Fitorecuperación de Suelos. Tesis Doctoral, UAM.
- Vázquez, S., Esteban, E., Goldsbrough, P., 2005. Arsenate-induced phytochelatin in white lupin: influence of phosphate status. *Physiology Plantarum* 124: 41-49.
- Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M.J., Esteban, E., Peñalosa, J.M., Carpena, R.O., 2006a. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water, Air, & Soil Pollution* 177: 349–365.
- Vázquez, S., Goldsbrough, P., Carpena, R.O., 2006b. Assessing the relative contributions of phytochelatin and the cell wall to cadmium resistance in white lupin. *Physiologia Plantarum* 128: 487-495.
- Vázquez, S., Moreno, E., Carpena, R., 2007. Role of iron in the retention of As by cell walls of lupin roots. COST meeting, Vilnius, Lituania, Junio 2007.

- Vázquez, S., Moreno, E., Carpena, R.O., 2008a. Bioavailability of metals and As from acidified multicontaminated soils: use of white lupin to validate several extraction methods. *Environmental Geochemistry & Health* 30: 193-198.
- Vázquez, S., Esteban, E., Carpena, R.O., 2008b. Evolution of arsenate toxicity in nodulated white lupine in a long-term culture. *Journal of Agricultural Food & Chemistry* 56: 8580-8587.
- Vázquez, S., Carpena, R.O., Bernal M.P., 2008c. Contribution of heavy metals and As-loaded lupin root mineralization to the availability of the pollutants in multi-contaminated soils. *Environmental Pollution* 152: 373-379.
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*: 12364-12372.
- Verkleij, J.A.C., Golan-Goldhirst, A., Antosiewicz, D.M., Schwitzguébel, J.-P., Schröder, P., 2009. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany* 67, 10-22.
- Vetterlein, D., Szegedi, K., Neackermann, J., Mattusch, J., Neue, H.U., Tanneberg, H., Jahn, R., 2007. Competitive mobilization of phosphate and arsenate associated with goethite by root activity. *Journal of Environmental Quality* 36: 1811–1820.
- Vithanage, M., Senevirathna, W., Chandrajith, R., Weerasooriya, R., 2007. Arsenic binding mechanisms on natural red earth. A potential substrate for pollution control. *Science of the Total Environment* 379: 244-248.
- VROM (Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment), 2009. Soil Remediation Circular. Países Bajos.
- Wang, S., Mulligan, C., 2006. Natural attenuation processes for remediation of arsenic contaminated soils and groundwater. *Journal of Hazardous Materials* 138, 459-470.
- Warren, G.P., Alloway, B.J., Lepp, N.W., Singh, B., Bocheureau, F.J.M., Penny, C., 2003. Field trials to assess the uptake of arsenic by vegetables from contaminated soils and soil remediation with iron oxides. *Science of the Total Environment* 311: 19-33.
- Waychunas, G.A., Fuller, C.C., Rea, B.A., Davis, J.A., 1993. Surface chemistry of ferrihydrite: 1. EXAFS studies on the geometry of coprecipitated and adsorbed arsenate. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 57, 2251-2269.
- Waychunas, G.A., Fuller, C.C., Rea, B.A., Davis, J.A., 1996. Wide angle X-ray scattering (WAXS) study of “two-line” ferrihydrite structure: effect of arsenate sorption and counterion variation in comparison with EXAFS results. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 60, 1765-1781.
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307–313.
- Weng, L., Van Riemsdijk, W.H., Hiemstra, T., 2009. Effects of fulvic acids on arsenate adsorption to goethite: experiments and modelling. *Environmental Science & Technology* 43: 7198-7204.
- Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingeder, G., Lombi, E., Adriano, D.C., 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Analitica Chimica Acta* 436: 309-323.

- Wenzel, W.W., Brandstetter, A., Lombi, E., Prohaska, T., Stingeder, G., Adriano, D.C., 2002. Arsenic in field-collected soil solutions and extracts of contaminated soils and its implication to soil standards. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165: 221-228.
- Wenzel, W.W., 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant & Soil* 321: 385-408.
- Williams, M., 2001. Arsenic in mine waters: an international study. *Environmental Geology* 40: 267-278.
- Woolson, E.A., 1973. Arsenic phytotoxicity and uptake in six vegetable crops. *Weed Science* 21:524-527
- Xie, Z.M., Naidu, R., 2006. Factors influencing bioavailability of arsenic to crops. En: Naidu, R., y col. Eds. *Managing Arsenic in the Environment. From Soils to Human Health*. CSIRO Pub., Collingwood, Australia, pp. 223-234.
- Xu, X.Y., McGrath, S.P., Zhao, F.J., 2007. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist* 176: 590-599.
- Xu, P., Christie, P., Liu, Y., Zhang, J., Li, X., 2009. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* can enhance arsenic tolerance in *Medicago truncatula* by increasing plant phosphorus status and restricting arsenate uptake. *Environmental Pollution* 156: 215-220.
- Yu, Y., Zhang, S., Huang, H., Luo, L., Wen, B., 2009. Arsenic accumulation and speciation in maize as affected by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossaeae*. *Journal of Agricultural Food & Chemistry* 57: 3695-3701.
- Zabłudowska, E., Kowalska, J., Jedynak, Ł., Wojas, S., Skłodowska, A., Antosiewicz, D.M., 2009. Search for a plant for phytoremediation – What can we learn from field and hydroponic studies? *Chemosphere* 77, 501-507.
- Zhang, W., Cai, Y., Tu, C., Ma, L.Q., 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *Science of the Total Environment* 300: 167-177.
- Zhang, H., Selim, H.M., 2008. Reaction and transport of arsenic in soils: equilibrium and kinetic modeling. *Advances in Agronomy* 98: 45-115.
- Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P., 2002. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytologist* 156: 27-31.
- Zhao, F.J., Wang, J.R., Barker, J.H.A., Schat, H., Bleeker, P.M., McGrath, S.P., 2003. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist* 159: 403-410.
- Zhao, F.J., Ma, F., Meharg, A.A., McGrath, S.P., 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* 181:777-794.
- Zhao, F.-J., McGrath, S.P., 2009. Biofortification and phytoremediation. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 373-380.
- Zhu, Y.-G., Rosen, B.P., 2009. Perspectives for genetic engineering for the phytoremediation of arsenic-contaminated environments: from imagination to reality? *Current Opinion in Biotechnology* 20: 220-224.
- Zornoza, P., Millán, R., Sierra, M.J., Seco, A., Esteban, E., 2010. Efficiency of white lupin in the removal of mercury from contaminated soils: soil and hydroponic experiments. *Journal of Environmental Sciences* 22: 1-7.